

Bildung von Aminoreduktonen aus Zuckern
– Nachweis und Reaktionen –

Gabriele Fritsch

1902

Bildung von Aminoreduktoren aus Zuckern

- Nachweis und Reaktionen -

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Gabriele Fritsch

aus Offenburg/Baden

München 1982

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung : 20. 12. 1982



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie
und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität
München auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Theodor Severin

angefertigt. Für die stets großzügige Förderung und
Unterstützung dieser Arbeit spreche ich Herrn Professor
Dr. Th. Severin meinen herzlichen Dank aus.

Herrn Dr. F. Ledl gilt mein Dank für die Betreuung
dieser Arbeit, für wertvolle Anregungen, Ratschläge
und Diskussionen.

Frau I. Stekker möchte ich für die Anfertigung der
NMR-Spektren und Elementaranalysen,
Frl. E. Visintainer und Herrn Dr. H. Lerche für die
Aufnahme der Massenspektren danken.

INHALTSVERZEICHNIS

THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung

1.1. Aufgaben

1.2. Bedeutung des Themas

1.3. Aufbau des Buches

1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.6. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.7. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.8. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.9. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.10. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.11. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.12. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.13. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.14. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.15. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.16. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.17. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

1.18. Zusammenfassung der Ergebnisse des Buches

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

THEORETISCHER TEIL	Seite
Einleitung	1
1. Reduktone	2
2. Reduktone aus Zuckern	5
2.1 Reduktonate	5
2.2 aci-Reduktone aus Zuckern unter Säure- und Basenkatalyse	6
2.2.1 Das Trioseredukton (<u>11</u>)	6
2.2.2 Die Reduktinsäure (<u>12</u>)	8
2.3 Reduktone aus Zuckern in Gegenwart von Aminen	10
2.3.1 Stickstofffreie Reduktone	10
2.3.1.1 Das Diacetylformoin (<u>30</u>)	14
2.3.1.2 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranon (<u>29</u>)	15
2.3.1.3 4-Hydroxy-5-methyl-2,3-dihydrofuran-3-on (<u>33</u>) und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-2,3-dihydrofuran-3-on (<u>32</u>)	17
2.3.2 Aminoreduktone aus sekundären Aminen	18
2.3.2.1 Das Amino-Hexose-Redukton (<u>38</u>)	18
2.3.2.2 C4-Aminoreduktone	20
2.3.3 Aminoreduktone aus primären Aminen	21
2.3.3.1 Das C4-Methylaminoredukton (<u>48</u>)	24
3. Nachweis von Reduktonen	24

	Seite
3.1	Allgemeine Bestimmungsmethoden für Reduktone 24
3.2	Nachweismethoden für Aminoreduktone 25
3.2.1	Nachweis des Amino-Hexose-Reduktions (38) 26
3.2.2	Nachweis des C4-Methylaminoreduktions (48) 27
3.2.3	C4-Aminoreduktone mit primären Aminresten 28
3.2.3.1	Synthese verschiedener C4-Aminoreduktone mit Aminosäureestern 28
3.2.3.2	Umsetzung mit Alkyl- und Arylhydrazinen 32
3.3	GC-Bestimmung der C4-Aminoreduktone als Hydroxypyrazole 38
3.3.1	Ausarbeitung einer Nachweismethode 38
3.3.2	Blindversuch und Überprüfung der Nachweismethode 43
3.3.3	Nachweis in Bräunungsgemischen von Mono- und Disacchariden 45
3.3.4	Nachweis des C4-Aminoreduktions in Malzextrakt 47
3.4	Isolierung weiterer Hydroxypyrazole aus Bräunungsgemischen 48
3.5	Anwendung der Nachweismethode auf weitere bekannte Reduktone aus Zuckern 50
3.6	Methylierung der Hydroxypyrazole 53
3.7	Derivatisierung des Piperidino-Hexose-Reduktions 54

	Seite
4. Abbauprodukte des Piperidino-Hexose-Reduktions (<u>38</u>)	59
4.1 Isolierung der Hydrolyseprodukte	59
4.2 Eigenschaften von <u>85</u> und <u>86</u>	64
4.3 Derivate der Methylenreduktinsäure(<u>85</u>) und des 3-Hydroxy-4-methyl-cyclopent-3-en-1,2-dions (<u>86</u>)	68
4.4 Reaktionsprodukt von <u>38</u> mit primären Aminen	70
5. Zusammenfassung	73

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Methoden	75
1. Bräunungsreaktionen von Glucose mit Methylamin	77
1.1 Isolierung des C4-Methylaminoreduktions (<u>48</u>)	77
1.2 Gaschromatographische Bestimmung des C4-Methyl- aminoreduktions (<u>48</u>)	78
2. 1-Ethylether des Methylreduktions (<u>52</u>)	78
3. Umsetzung des C4-Morpholinoreduktions (<u>51</u>) mit Amino- säureestern	79
3.1 C4-Glycinesterreduktion (<u>54</u>)	79
3.2 Herstellung von <u>56</u> aus <u>51</u> und Alaninmethylester	80
3.3 Herstellung von <u>55</u> aus <u>51</u> und Phenylalaninmethylester	81
4. Allgemeine Vorschrift zur Umsetzung von offenkettigen Reduktionen mit Hydrazin	82

4.1	1,3-Dimethyl- und 1,5-Dimethyl-4-hydroxypyrazole (<u>58/59</u>)	82
4.2	4-Hydroxy-3-methyl-1-phenyl- und 4-Hydroxy-5-methyl- 1-phenyl-pyrazol (<u>66/66a</u>)	84
4.3	1-Benzyl-4-hydroxy-3-methyl- und 1-Benzyl-4-hydroxy- 5-methyl-pyrazol (<u>67/67a</u>)	85
4.4	4-Hydroxy-3-methyl-1-propyl- und 4-Hydroxy-5-methyl- 1-propyl-pyrazol (<u>68/68a</u>)	85
4.5	Reaktion von <u>58/59</u> mit HCl	86
5.	Ausarbeitung einer Nachweismethode	87
5.1	Überprüfung der Derivatisierungsmöglichkeit mit Methylhydrazin und Wiederfindungsversuch	87
5.2	Bestimmung des Verlustes von <u>58/59</u> beim Ausschütteln im Sauren und Basischen	88
5.3	Glucose-Glycin-Blindversuch	89
5.4	Vergleich der direkten gaschromatographischen Be- stimmung der C4-Aminoreduktone mit der gravimetrischen bzw. indirekten GC-Bestimmung über die Hydroxy- pyrazole <u>58/59</u>	89
5.4.1	Gravimetrische Bestimmung	89
5.4.2	Direkte GC-Bestimmung von <u>48</u>	90
5.4.3	GC-Bestimmung von <u>48</u> über die Hydroxypyrazole <u>58/59</u>	90
6.	Allgemeine Vorschrift zum Nachweis des C4-Aminoreduktions in Zucker-Amin-Bräunungsgemischen	91

	Seite
6.1 Bräunungsreaktionen von Zuckern mit Glycin	91
6.2 Nachweis der C4-Aminoreduktone in Malzextrakt	92
7. Umsetzung von Bräunungsprodukten mit Methylhydrazin	92
7.1 Herstellung von <u>71a,b</u> bzw. <u>72</u> aus Diacetylformoin	92
7.2 Isolierung von <u>71a,b</u> bzw. <u>72</u> aus einem Glucose-Methylamin-Bräunungsgemisch	93
7.3 Umsetzung des Triosereduktions (<u>11</u>) mit Methylhydrazin	93
7.4 Umsetzung des Methylreduktions (<u>65</u>) mit Methylhydrazin	94
7.5 Umsetzung des 1-Ethylethers des Methylreduktions (<u>52</u>) mit Methylhydrazin	94
7.6 Umsetzung des 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranon (<u>29</u>) mit Methylhydrazin	95
7.7 Umsetzung des 4-Hydroxy-5-methyl-2,3-dihydrofuran-3-on (<u>33</u>) mit Methylhydrazin	96
7.8 Umsetzung des Piperidino-Hexose-Reduktions (<u>38</u>) mit Methylhydrazin	96
8. Derivatisierung der Hydroxypyrazole	98
8.1 Methylierung von <u>58/59</u>	98
8.2 Methylierung von <u>75</u>	99
9. Allgemeine Vorschrift zur Umsetzung von <u>38</u> mit O-substituierten Hydroxylaminen	100
9.1 Umsetzung von <u>38</u> mit Hydroxylamin-Hydrochlorid	100

	Seite
9.2 Umsetzung von <u>38</u> mit O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid	101
9.3 Umsetzung von <u>38</u> mit O-Benzylhydroxylamin-Hydrochlorid	101
10. Isolierung der Hydrolyseprodukte <u>85</u> , <u>86</u> und <u>88</u>	102
11. Derivate der Verbindungen <u>85</u> und <u>86</u>	104
11.1 Umsetzung der Diketoverbindung <u>86</u> mit O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid	104
11.2 Umsetzung von <u>85</u> mit O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid	105
11.3 Reaktion der Methylenreduktinsäure (<u>85</u>) mit methanolischer HCl	105
12. Gaschromatographische Bestimmung von <u>97</u> und <u>98</u>	106
13. Synthese der Aminoreduktone <u>99</u> und <u>100</u>	106
13.1 Herstellung des Aminoreduktions <u>99</u> aus <u>38</u> und <u>85</u>	106
13.2 Herstellung des Aminoreduktions <u>100</u> aus <u>38</u>	108
Literaturverzeichnis	109
Lebenslauf	111

THEORETISCHER THEIL

Einleitung

Im Jahre 1912 veröffentlichte L.C.Maillard ¹ Studien über die Umsetzung von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren. Er beobachtete, daß sich eine wässrige Glucose-Glycin-Lösung beim Erhitzen schon bei Temperaturen von 50° - 80°C langsam verfärbte und unter Gasentwicklung braune Pigmente gebildet wurden. Diese als nichtenzymatische Bräunung bekannte Reaktion hat in der Lebensmittelverarbeitung große Bedeutung; denn die Maillard Reaktion ist nicht nur für die Bräunung beim Backen, Braten oder Rösten verantwortlich, sondern auch wichtig für die Aromabildung bei der Zubereitung von Lebensmitteln. In vielen Fällen, vor allem in der Lebensmitteltechnologie, ist sie allerdings unerwünscht, da Geruch, Geschmack, sowie Farbe während der Herstellung oder Lagerung oft negativ verändert werden und der Abbau von wertvollen Aminosäuren zu einer Minderung des Nährwertes führt.

Zahlreiche Forschungsarbeiten wurden in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Maillard Reaktion durchgeführt. Modellreaktionen brachten Erkenntnisse über wichtige Reaktionswege und gleichzeitig gelang die Isolierung und Identifizierung zahlreicher Zwischen- und Endprodukte.

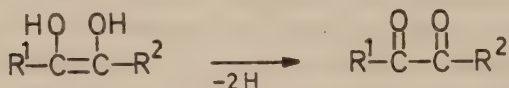
Die wichtigsten Aspekte, unter denen man die Bräunungsreaktionen betrachten kann sind sicher Aroma- und Farbbildung; vielleicht weil sie zu den wahrnehmbaren Eindrücken gehören. Durch Isomerisierung, Dehydratisierung sowie Kondensation oder Spaltung erhält man eine ganze Palette organischer Verbindungen, die ein enormes synthetisches Potential für Folgereaktionen darstellen. So können

z.B. niedermolekulare Bruchstücke zu höhermolekularen Pigmenten kondensieren und durch ihre chemischen Eigenschaften den Charakter des erhitzten Lebensmittels bestimmen.

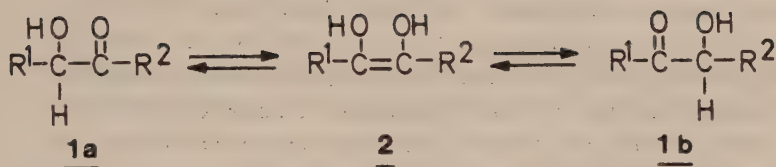
Im Verlaufe des Zuckerabbaus bilden sich u.a. auch reduzierende Substanzen, die für die Haltbarkeit und Stabilität zahlreicher Lebensmittel verantwortlich sind, und auf Grund dieser typischen Eigenschaft den Reduktionen zugeordnet werden.

1. Reduktone

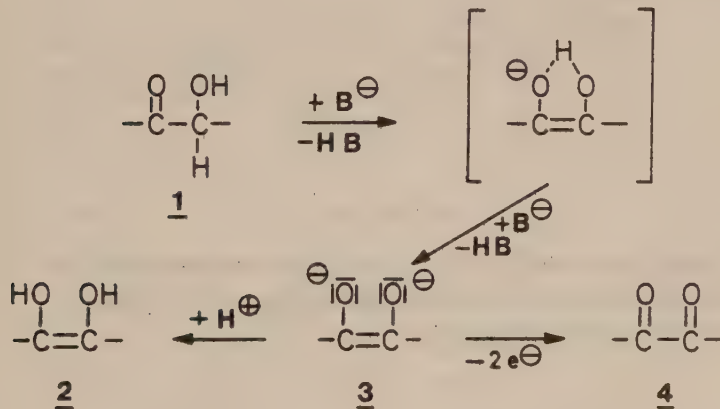
Unter dem Begriff Reduktone faßt man eine Klasse organischer Verbindungen zusammen, die auf Grund einer Endiolgruppierung ein ausgeprägtes Reduktionsvermögen aufweisen.



Die Stabilität der Endiole (2), die mit α -Hydroxycarbonylverbindungen (1a, 1b) im tautomeren Gleichgewicht stehen, ist von den Resten R^1 und R^2 abhängig. Durch sterische Einflüsse oder induktive Effekte, sowie die Möglichkeit zur Konjugation mit Nachbargruppen, kann die Gleichgewichtslage zu Gunsten der Endiolform verschoben werden.

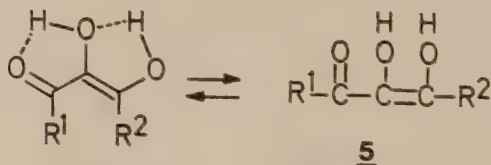


Die Salze der Endiole (3), die sich in Gegenwart von Basen aus den α -Hydroxycarbonylverbindungen (1) bilden, sind starke Reduktionsmittel und werden als Reduktonate bezeichnet. Beim Ansäuern gehen sie wieder in die entsprechenden Acyloine (1) über.



Durch eine Carbonylgruppe in Nachbarschaft zur Doppelbindung kann die reduzierend wirkende Endiolform auch in saurer Lösung stabilisiert werden. Diese Carbonyl-Endiole sind vinyloge Carbonsäuren. Da sie im Gegensatz zu den Reduktonaten auch in saurer Lösung reduzierend wirken, bezeichnet man sie als aci-Reduktone. Charakteristisch für Verbindungen mit diesem Strukturelement ist die Ausbildung eines 5-Ring-Doppelchelatkomplexes.

Wie Euler ² zeigen konnte, liegen dabei alle drei Sauerstoffatome auf einer Seite. Die Hydroxygruppen sind in cis-Stellung fixiert und können - auch im Säuren - leicht oxidiert werden.

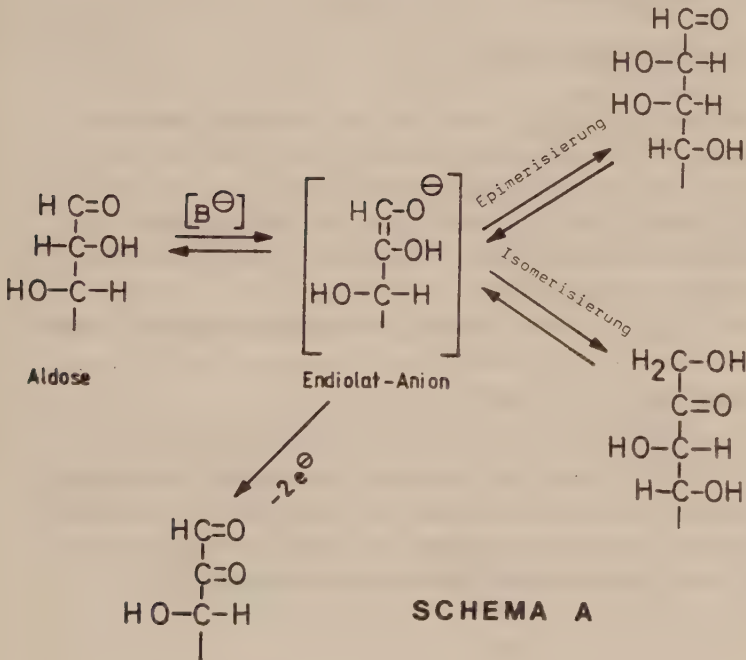


Zu den Reduktonen zählt man auch solche Verbindungen, bei denen eine oder beide Hydroxylgruppen durch $-\text{NH}_2$, $-\text{NR}_2$ oder $-\text{SH}$ -Gruppen ersetzt sind.

2. Reduktone aus Zuckern

2.1 Reduktonate

Glucose und andere Monosaccharide werden als reduzierende Zucker bezeichnet. Im Alkalischen erfolgt Reaktion mit zahlreichen Oxidationsmitteln, die man zur quantitativen Bestimmung von Aldosen, Ketosen und Disacchariden mit freien Carbonylgruppen ausnützt. Unter der Einwirkung von



Alkali kommt es zur Isomerisierung und Epimerisierung. Über eine Endiolat-Zwischenstufe bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Aldosen und Ketosen aus (Lobry de Bruyn-Umlagerung). Diese Reduktonate werden in Gegenwart von Oxidationsmitteln leicht dehydriert und sind somit für die reduzierende Wirkung von Hexosen verantwortlich. (Siehe Schema A)

2.2 Bildung von aci-Reduktonen aus Zuckern unter Basen- und Säurekatalyse

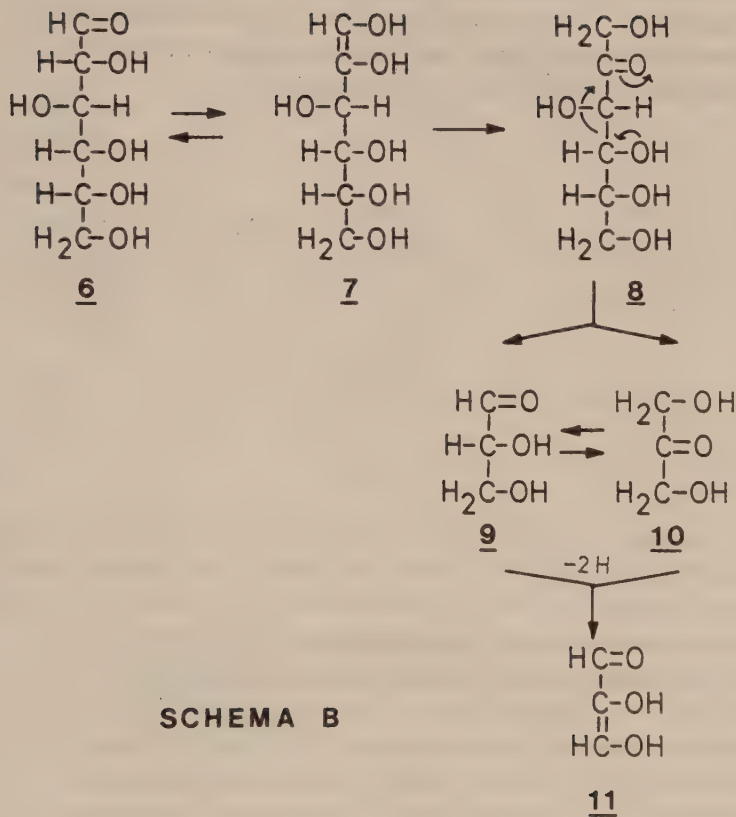
2.2.1 Das Trioseredukton

Das Trioseredukton (11) wurde als einfachstes Redukton zuerst von H. Euler und C. Martius ³ 1933 bei der Umsetzung von Glucose mit Natronlauge isoliert. In guten Ausbeuten erhält man es unter gleichen Bedingungen auch aus anderen Kohlenhydraten, sowie aus Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd.

Ein von Euler ² vorgeschlagener Bildungsmechanismus wurde von H.F. Bauer und C. Teed ⁴ durch Umsetzen von radioaktiv markierter Glucose bestätigt.

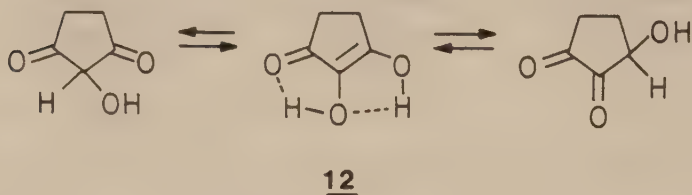
Nach einer Tautomerisierung kommt es unter Retro-Aldol-Reaktion zur Spaltung des Hexosemoleküls. Die intermediär gebildeten Triosen Dihydroxyaceton (10) und Glycerinaldehyd (9) liefern dann wiederum über die Endiolate zu gleichen Teilen durch Dehydrierung das Trioseredukton (11).

(Siehe Schema B)

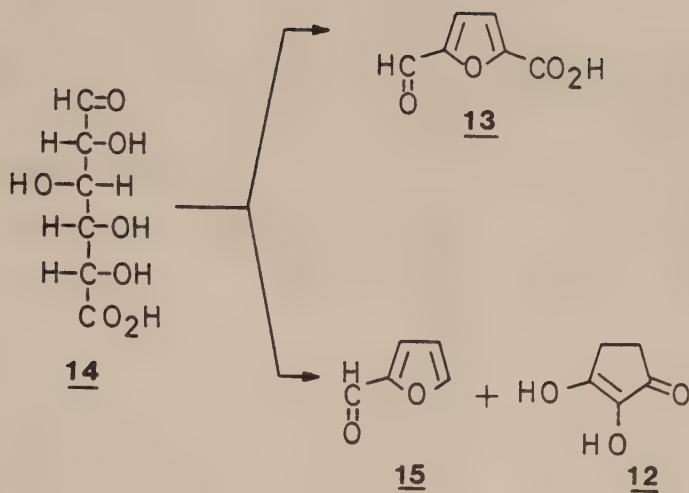


2.2.2 Die Reduktinsäure

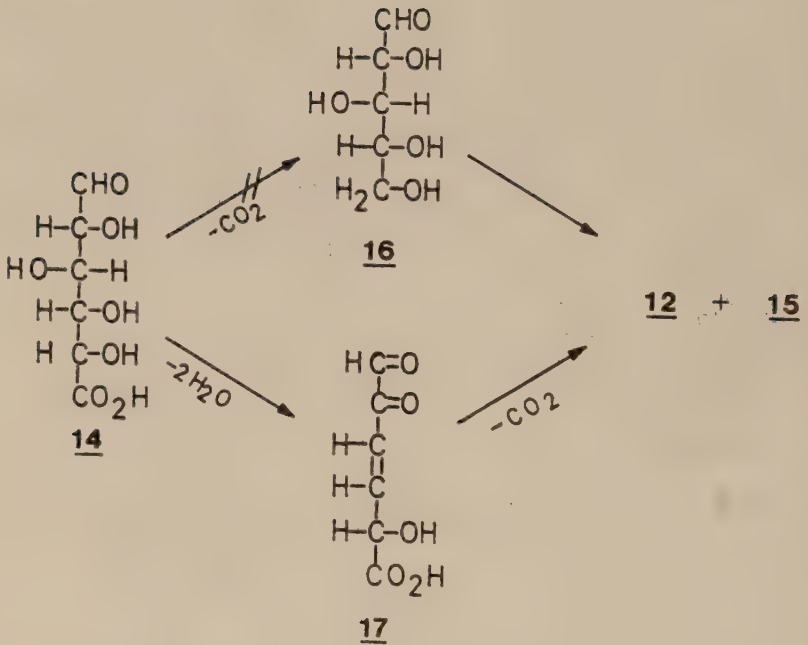
Bei der Hydrolyse verschiedener Kohlenhydrate wie D-Xylose, Pektin und L-Glucuronsäure isolierten T. Reichstein und R. Oppenauer ⁵ eine Verbindung, der sie auf Grund ihrer sauren Eigenschaft und ihrer reduzierenden Wirkung den Trivialnamen Reduktinsäure (12) gaben.



Die Verbindung zeigt die für Reduktone typischen Reaktionen. Sie gibt mit Eisen (III)-chlorid eine blaue Färbung und reduziert Jod ⁶. Die aci-Reduktonstruktur wird durch Bildung eines Doppelten-Fünfring-Chelatkomplexes und die in cis-Stellung angeordneten Hydroxy-Gruppen stabilisiert. Wichtigstes Ausgangsmaterial zur Herstellung der Reduktinsäure sind die Hexuronsäuren ^{7,8}. Beim Erwärmen der Zuckersäuren in saurer Lösung konnten Reichstein und Oppenauer ⁵ drei Hauptprodukte isolieren : 5-Formylfuran-carbonsäure-(2) (13), Furfurol (15) und Reduktinsäure (12).



E. Stutz und S. Garbutt⁸ formulierten als Zwischenstufe eine β, γ -ungesättigte Carbonsäure (17), die unter CO_2^- Abspaltung cyclisieren könnte.



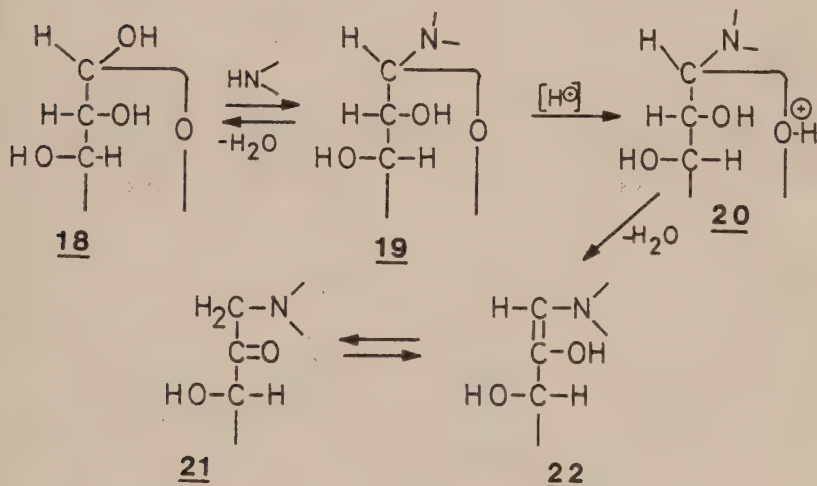
2.3 Reduktone aus Zuckern in Gegenwart von Aminen

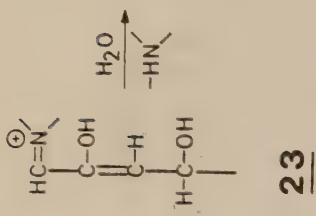
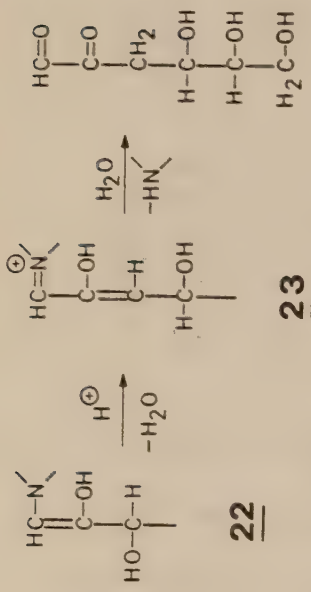
2.3.1 Stickstofffreie Reduktone

Beim Erwärmen von Zuckern in Gegenwart von Aminen werden z.T. die gleichen Zuckerabbauprodukte gebildet wie bei den säure- oder basenkatalytischen Bräunungsreaktionen: z.B. Furfurol bei Pentosen oder Hydroxymethylfurfurol bei Hexosen.

Zusätzlich entstehen bei diesen thermischen, aminkatalysierten Zuckerumwandlungen einige charakteristische Substanzen. Welche Verbindungen dabei bevorzugt gebildet werden, hängt in erster Linie von den Reaktionsbedingungen ab (Temperatur, Lösungsmittel, pH-Wert).

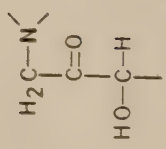
Aus Aldosen (18) und primären oder sekundären Aminen entstehen unter Wasserabspaltung Glycosylamine der Struktur 19, die dann unter Säurekatalyse in die entsprechenden 1-Desoxy-1-amino-ketosen (21) übergehen ("Amadori-Umlagerung")^{9,10}. Ketosen bilden über die Ketosylamine die 2-Desoxy-2-aminoaldosen ("Heyns-Carson-Umlagerung")¹¹.



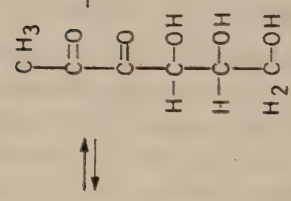
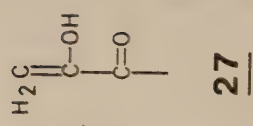
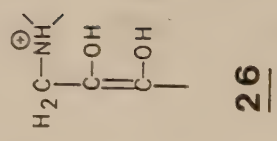
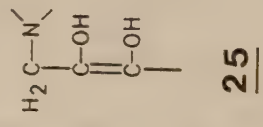


24

5-Hydroxymethylfurfural
2-Furfuraldehyd

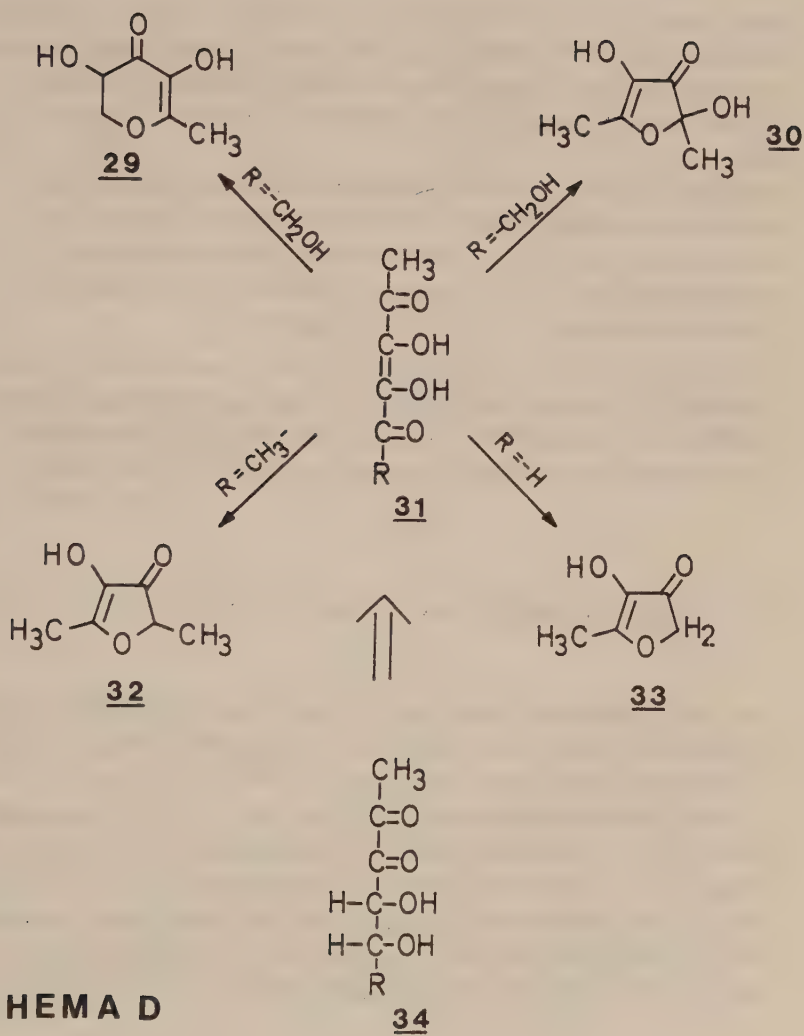


21



28

Furanone
Pyranone
Reduktone
Methylglyoxal



SCHEMA D

Das Amadori-Produkt (21) bildet reversibel durch 1,2-Enolisierung das 1,2-Enaminol 22, das unter Verlust des Aminrests in die 3-Desoxy-1,2-dicarbonyl-Zwischenstufe 24 übergeht. In Konkurrenz dazu führt 2,3-Enolisierung zum 1-Desoxyoson 28.

24 entsteht bevorzugt im sauren Milieu und reagiert zu Furfurolderivaten weiter, während sich unter neutralen Bedingungen 28 bildet, die Vorstufe vieler bekannter Zuckerabbauprodukte wie Maltol, Isomaltol, verschiedene Pyranone, sowie Methylfuranone (Schema C).

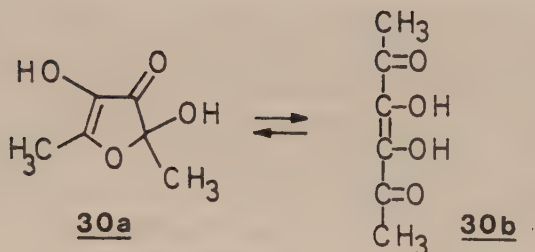
Wie Schema D zeigt, entstehen aus dem 1-Desoxyoson 28 bzw. aus der allgemeinen Struktur 34 Zuckerumwandlungsprodukte, die man auf Grund ihrer reduzierenden Eigenschaften und ihrer Struktur ebenfalls zu den Reduktionen zählen muß.

2.3.1.1 Das Diacetylformoin (30)

Das 2,5-Dimethyl-2,4-dihydroxyfuran-3-on (Diacetylformoin) (30) kann in der offenkettigen Form (30b) oder als cyclisches Halbacetal (30a) vorliegen.

In der offenkettigen Form (30b) ist das für die reduzierende Wirkung des Diacetylformoins verantwortliche Strukturelement, die Endiolgruppierung, zu erkennen.

Auf die reduzierenden Eigenschaften von cyclischen Reduktonethern, die ähnliche Struktur besitzen wie 30a, wird in Kap. 2.3.1.2 ausführlicher eingegangen.

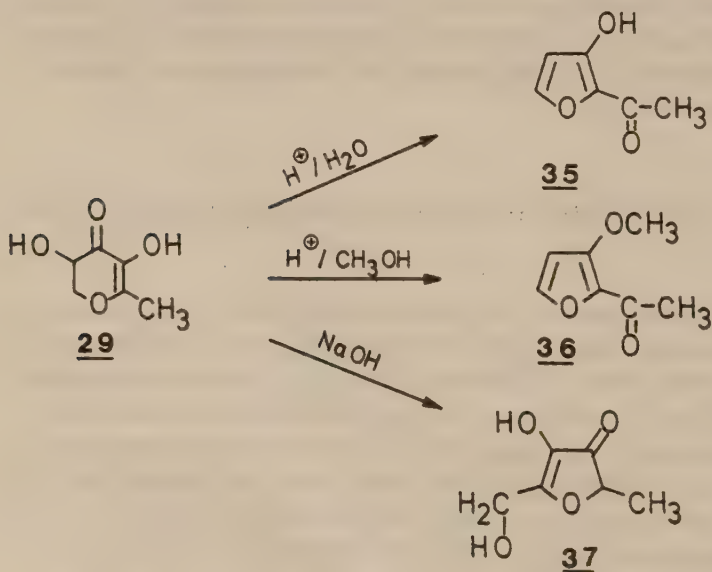


Das Diacetylformoin isolierten Mills und Hodge¹² bei der Vakuumpyrolyse von 1-Desoxy-1-prolino-D-fructose; G.R.Jurch und J.H.Tatum¹³ fanden 30 bei der Umsetzung von Glucose mit Methylamin.

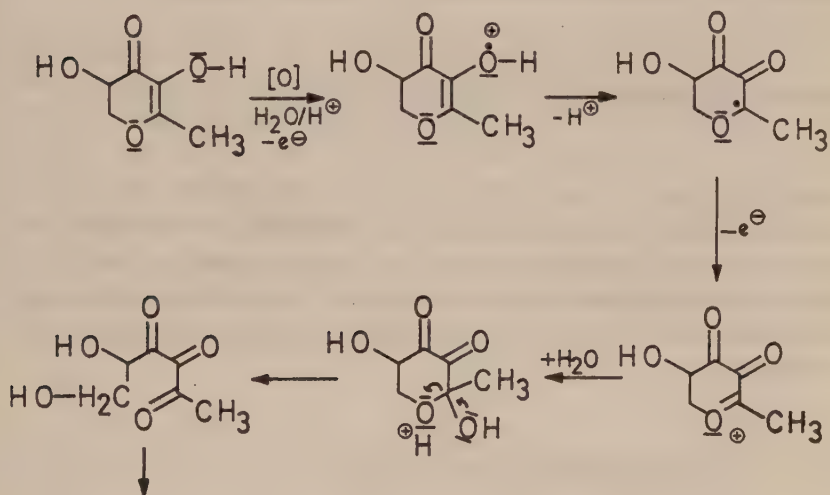
2.3.1.2 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranon (29)

Das Dihydropyranon 29 ist ein bei der thermischen Zuckerumwandlung aus Mono- und Disacchariden gebildetes charakteristisches Bräunungsprodukt, das mit primären oder sekundären Aminen¹⁴ und auch bei der Vakuumpyrolyse von Amdoriprodukten¹² erhalten wird. Geringe Mengen findet man auch beim säurekatalytischen Zuckerabbau. 29 konnte in vielen Lebensmitteln nachgewiesen werden. Es ist ein typisches Abbauprodukt, wenn kohlenhydrat- und eiweißreiche Nahrungsmittel während ihrer Herstellung oder Ver-

arbeitung erhöhten Temperaturen ausgesetzt sind. Wie Modellreaktionen zeigen, entstehen aus 29 unter bestimmten Bedingungen weitere Umwandlungsprodukte: Beim Erhitzen in saurer Lösung erfolgt Umlagerung zum Isomaltol (35)¹⁵, das sonst bevorzugt bei der Umsetzung von Lactose entsteht. In saurer methanolischer Lösung bildet sich der Isomaltolmethylether (36). Im Alkalischen lagert sich das Dihydropyranon unter Ringöffnung in das von Mills isolierte 2,3-Dihydro-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methylfuran-3-on (37) um¹⁶.



Die Verbindungen 29 und 37 besitzen reduzierende Eigenschaften. Mit Eisen(III)-chlorid geben sie eine intensive Blaufärbung. In Gegenwart von Tillmanns Reagenz oder Jod kommt es - auch in saurer Lösung - zur sofortigen Oxidation. Folgender Mechanismus kann für diese Redoxreaktion der cyclischen Reduktonether vorgeschlagen werden:



2.3.1.3 4-Hydroxy-5-methyl-2,3-dihydrofuran-3-on (33) und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-2,3-dihydrofuran-3-on (32)

Zwei Dihydrofurane, die beim aminkatalysierten Zuckerabbau entstehen, sind ebenfalls den Reduktonethern zuzuordnen: Mit Pentosen erhält man das 4-Hydroxy-5-methyl-2,3-dihydro-

furan-3-on (33)¹⁷ ; mit Rhamnose, einer Methylpentose, bildet sich wahrscheinlich über eine analoge Zwischenstufe das 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-2,3-dihydrofuran-3-on (32)^{18,19}. Beide Verbindungen 32 und 33 sind wichtige Aromakomponenten, die in einer ganzen Reihe erhitzter Lebensmittel meist zusammen mit 29 anzutreffen sind. 32 wurde als wichtige Geruchs- und Geschmackskomponente aus Ananas isoliert²⁰.

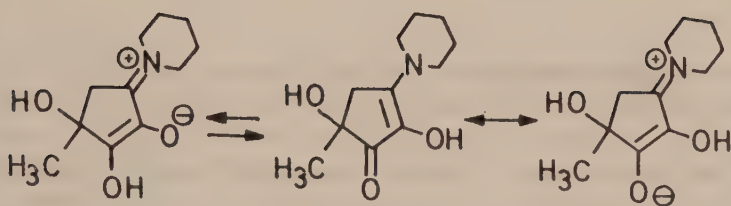
2.3.2 Aminoreduktone aus sekundären Aminen

Neben den bereits beschriebenen Bräunungsprodukten konnten beim Abbau von Amadoriprodukten bzw. bei der thermischen aminkatalysierten Zuckerumwandlung verschiedene stickstoffhaltige Verbindungen isoliert werden. Einige dieser Produkte besitzen Enaminolstrukturen und werden als Aminoreduktone bezeichnet.

2.3.2.1 Das Amino-Hexose-Redukton (38)

Hodge und Mitarbeiter²¹ isolierten ein Aminoredukton, dessen Struktur Weygand et al. sowie Hodge und Fischer²² als betainartiges Fünfring-aci-Redukton beschrieben.

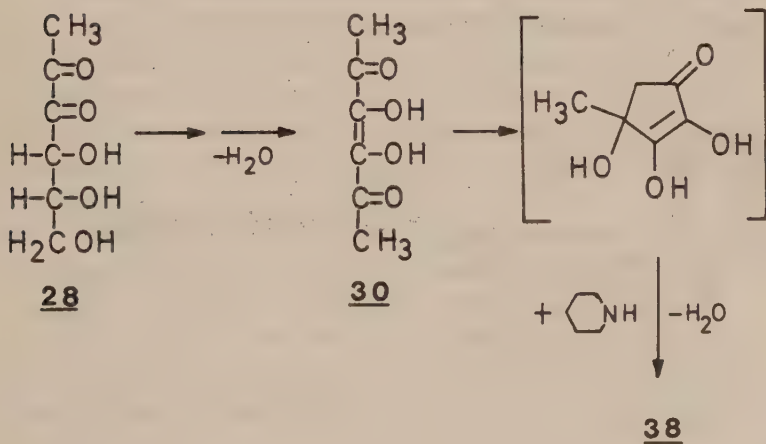
Das sogenannte Piperidino-Hexose-Redukton (38) besitzt die Struktur eines vinylogenen Säureamids. In saurer Lösung reduziert es zwei Äquivalente Jod oder Tillmanns Reagenz²³, was seinen Reduktoncharakter bestätigt.



38

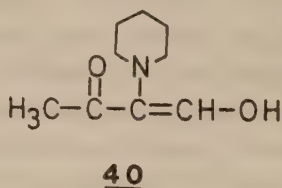
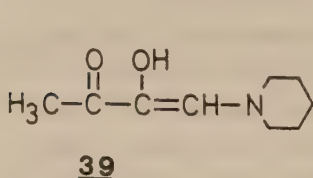
Mit Ausbeuten bis zu 30% erhält man 38, wenn Hexosen längere Zeit mit Piperidin und Eisessig erhitzt werden. Wie Simon und Heubach ²⁴ zeigten, entsteht 38 aus Ketonen in weit geringeren Mengen als aus Aldosen. Die Disaccharide Lactose bzw. Maltose bilden unter gleichen Bedingungen als Hauptprodukte Isomaltol bzw. Maltol ^{18,25}.

Weitere Untersuchungen von Simon und Heubach ^{24,26} mit radioaktiv markierter Glucose führten zur Formulierung des folgenden Bildungsmechanismus:

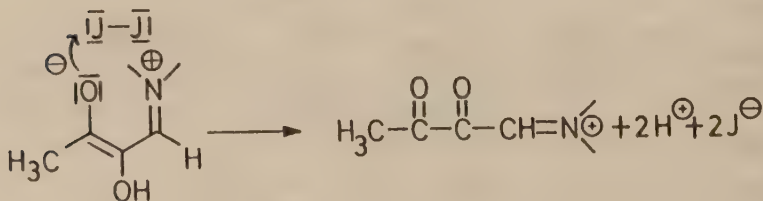


2.3.2.2 C4-Aminoreduktone

Hodge und Mitarbeiter ¹⁸ konnten aus einem Glucose-Piperidin-Bräunungsgemisch neben dem Hexose-Redukton 38 in geringen Mengen ein weiteres Aminoreduktion 39 isolieren. Beim thermischen Abbau von 1-Desoxy-1-piperidino-D-fructose erhielten sie zusätzlich ein 2-Aminoreduktion (40) ²⁷. Mit anderen sekundären Aminen wie N-Methylbenzylamin bilden Hexosen C4-Aminoreduktone mit zu 39 analoger Struktur.



Für die Oxidation des C4-Aminoreduktions wurde von Simon und Heubach ²³ folgender Mechanismus postuliert:



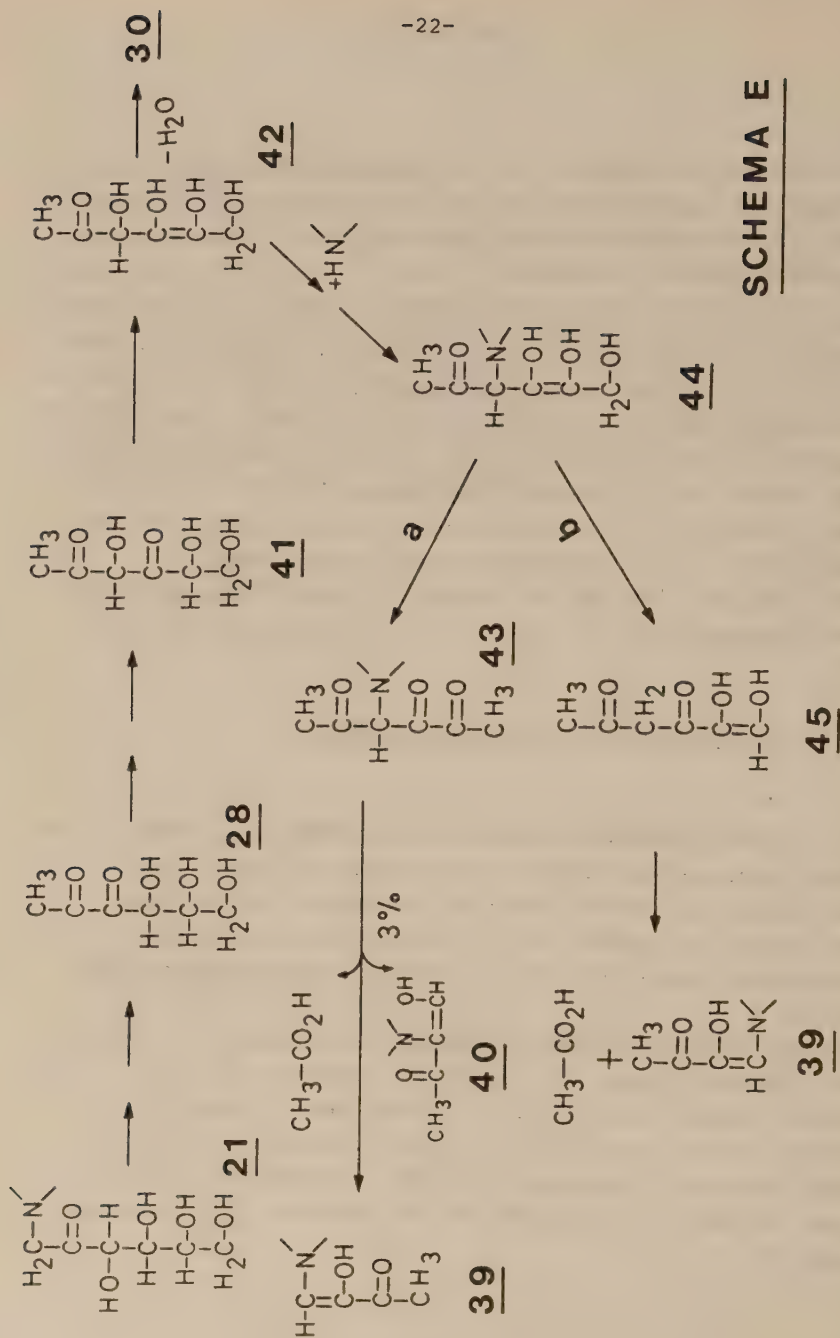
Ihre Versuchsergebnisse zeigen, daß nicht wie von Euler ² diskutiert zuerst Hydrolyse zum aci-Redukton erfolgt, sondern das Aminoredukton ohne Aminabspaltung direkt mit dem Oxidationsmittel reagiert.

Wie aus Untersuchungen mit radioaktiv markierter Glucose hervorgeht, sind die C₁- und C₂-Atome der Hexose nicht an der Bildung des C4-Aminoreduktons beteiligt. Das aus dem Amadoriprodukt abgespaltene sekundäre Amin lagert sich im Verlauf der Reaktion an das C₃-Atom des Hexosemoleküls an. Danach erfolgt Spaltung der Kohlenstoffkette in C₂- und C₄-Bruchstücke. Schema E zeigt den von Simon, Heubach und Mills ^{23,27} vorgeschlagenen Bildungsmechanismus. Über den Weg a dürfte der größte Teil des C4-Aminoreduktons gebildet werden.

2.3.3 Aminoreduktone aus primären Aminen

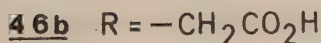
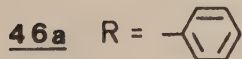
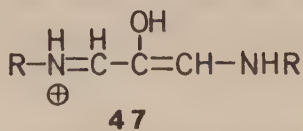
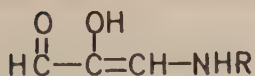
Die nichtenzymatische Bräunung von Lebensmitteln wird durch reduzierende Zucker und Aminosäuren oder Proteine verursacht. Im Protein sind es die freien Aminogruppen der basischen Aminosäuren, die mit den Kohlenhydraten reagieren. Diese sind wie die meisten Aminosäuren primäre Amine.

Die Ergebnisse der Modellreaktionen von Zuckern mit sekundären Aminen können nur auf solche Lebensmittel übertragen werden, die in relativ großer Menge sekundäre Amine, d.h. vor allem Prolin und Hydroxyprolin in freier Form enthalten. Denn nur in diesen Lebensmitteln sollten, wenn überhaupt, Aminoreduktone der Struktur 39 nachweisbar sein.



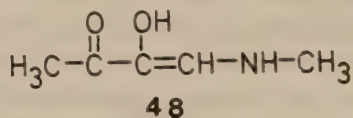
Aus Bräunungsgemischen von Zuckern und primärem Amin konnten Amino-Hexose-Reduktone des Typs 38 bisher noch nicht isoliert werden. Aus diesem Grund versuchten Simon und Heubach cyclische Aminoreduktone mit primärem Aminrest zu synthetisieren. Aus 1-Chlor-cyclopentan-2,3-dion erhielten sie aber nur Bis-amino-Produkte ²³.

Im Gegensatz dazu läßt sich das Trioseredukton (11) leicht mit Anilin oder p-Aminobenzoesäure zum β -Arylamino- α -hydroxy-acrolein (46a) umsetzen. Solche "Monoanile" eignen sich auf Grund ihrer hohen Stabilität zur Identifizierung und Isolierung der oft weniger stabilen aci-Reduktone. Mit verschiedenen Aminosäuren, wie Glycin, reagiert 11 in gleicher Weise zu 46b und mit einem Überschuß an Amin entsteht unter Säurekatalyse das Amidiniumsalz der Struktur 47



2.3.3.1 Das C4-Methylaminoreduktion (48)

Kürzlich gelang es Ledl und Severin ²⁸ aus einem Glucose-Methylamin-Bräunungsgemisch ein Aminoreduktion der Struktur 48 zu isolieren. Auch bei der Umsetzung von Glucose mit anderen primären Aminen konnten die entsprechenden Verbindungen der Struktur 48 isoliert werden.



Da diese C4-Aminoreduktone erstaunlich stabil sind und im Modellansatz in beachtlicher Menge entstehen, könnte man annehmen, daß sie auch bei der nichtenzymatischen Bräunung im Lebensmittel gebildet werden.

3. Nachweis von Reduktionen

3.1 Allgemeine Bestimmungsmethoden für Reduktone

Da Reduktone stark reduzierende Eigenschaften besitzen, wird

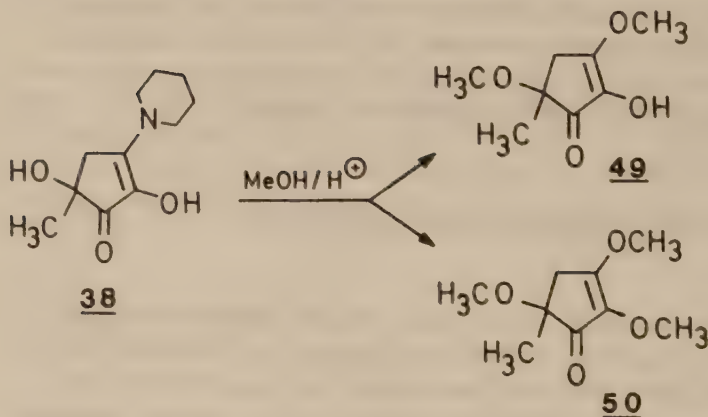
ihr Gehalt meist durch Titration mit Oxidationsmitteln bestimmt. Am gebräuchlichsten ist die Reaktion mit Jod oder Tillmanns Reagenz (2,6-Dichlorphenol-indophenol). Diese Bestimmungsmethoden sind aber nicht sehr spezifisch. In komplexeren Lösungen oder Lebensmitteln werden diese Redox titrationen durch andere reduzierende Verbindungen gestört, die dann einen höheren Reduktorgehalt vortäuschen als tatsächlich vorhanden ist. Damit der Reduktorgehalt bestimmt werden kann ist es erforderlich, diese Substanzen zuvor zu trennen. Zur quantitativen Bestimmung einzelner Reduktone nebeneinander ist es zweckmäßig, die Reduktone zu derivatisieren. Eine Möglichkeit ist die Reaktion zu Monoanilen oder Dianilsalzen, eine andere die Derivatisierung der Oxidationsprodukte z.B. mit o-Phenylen-diamin oder 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu den Chinoxalin- bzw. Hydrazonverbindungen. Die entstandenen Reaktionsprodukte können nach dünnschichtchromatographischer Trennung isoliert und charakterisiert werden.

3.2 Nachweismethoden für Aminoreduktone

Da im Lebensmittel eine ganze Reihe verschiedener Amine für die Reaktion zu Aminoreduktonen zur Verfügung stehen, ist es sehr schwierig, einzelne Reduktone gezielt in Mischungen nachzuweisen. Eine Bestimmung dieser Reduktone sollte erleichtert sein, wenn man sie unter Abspaltung der unterschiedlichen Aminreste zu leicht nachweisbaren Derivaten umsetzen kann.

3.2.1 Nachweis des Amino-Hexose-Reduktons (38)

Für das Amino-Hexose-Redukton (38) haben Severin und Pehr²⁹ eine empfindliche Nachweismethode ausgearbeitet. Aus 38 erhält man in Gegenwart von Methanol und p-Toluolsulfonsäure die leichtflüchtigen Dimethyl- und Trimethylether 49 bzw. 50, die eine gaschromatographische Bestimmung des Reduktons ermöglichen.



3.2.2 Nachweis des C4-Methylaminoreduktons (48)

Da das C4-Aminoredukton ursprünglich nur in geringen Mengen und aus Bräunungsgemischen mit sekundären Aminen isoliert werden konnte, glaubte man, daß seine Bildung beim Zuckerabbau keine große Rolle spielt. Erst nachdem Ledl und Severin ²⁸ das C4-Methylaminoredukton (48) aus Glucose-Methylamin-Bräunungsgemischen in relativ großen Mengen kristallin isolieren konnten, mußte man annehmen, daß es auch in Lebensmitteln bei der nichtenzymatischen Bräunung u.U. in größeren Mengen entsteht.

Das C4-Methylaminoredukton (48) wird mit Methylenchlorid aus Bräunungsansätzen extrahiert. Trotz seiner Oxidations- und Temperaturempfindlichkeit kann es, neben einer ganzen Reihe anderer Zuckerabbauprodukte, gut gaschromatographisch identifiziert werden.

In Lebensmitteln kann man erwarten, daß C4-Aminoreduktone entstehen, die mit polaren Aminosäuren oder den basischen Seitenketten der Proteine verbunden sind. In solchen Fällen ist ein direkter gaschromatographischer Nachweis nicht mehr möglich. Es sollte also eine Nachweismethode gefunden werden, die es erlaubt, das C4-Aminoredukton unter Abspaltung des Aminrestes zu einem charakteristischen, leicht zu isolierenden Derivat umzusetzen.

3.2.3 C4-Aminoreduktone mit primären Aminresten

3.2.3.1 Synthese verschiedener C4-Aminoreduktone mit Aminosäureresten

Um festzustellen, wie leicht der Aminrest gegen andere Reste ausgetauscht werden kann, versuchte ich analog einer Vorschrift von Simon und Heubach²³ den Methylaminrest des Aminoreduktons 48 durch Morpholin zu ersetzen. Beim Erwärmen von 48 mit Morpholin in wässriger, ethanolischer Lösung konnte nach Hochvakuumsublimation eine kristalline Verbindung isoliert werden. Aus dem Molekülpeak des Massenspektrums ergibt sich das Molekulargewicht 130. Wichtige Strukturhinweise liefert das NMR-Spektrum, das dem des C4-Methylaminoreduktons sehr ähnlich ist. Anstelle des Dubletts der -NH-CH_3 -Gruppe bei $\delta = 3,02$ ppm erkennt man im Spektrum ein Triplett bei $\delta = 1,40$ ppm und ein Quadruplett bei $\delta = 4,10$ ppm ($J = 6,0$ Hz), was vermuten läßt, daß der Aminrest durch eine Ethoxygruppe substituiert wurde. Das IR-Spektrum zeigt eine schwache Bande bei 1680 cm^{-1} und eine stark verbreiterte Bande bei $1630 - 1635\text{ cm}^{-1}$. Der Vergleich mit bekannten Spektren³⁰ bestätigt die Struktur als 1-Ethylether des Methylreduktons (52). Längere Lagerung von 52 bei Raumtemperatur führt zur Bildung eines gelben Öles durch Umlagerung zum isomeren Ethoxydiacetyl (53) (Schank, Wessling³⁰).

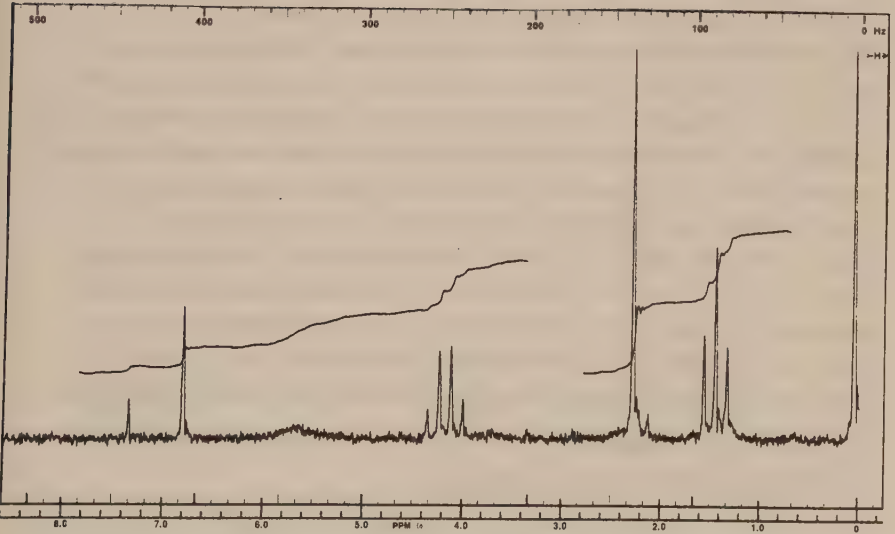
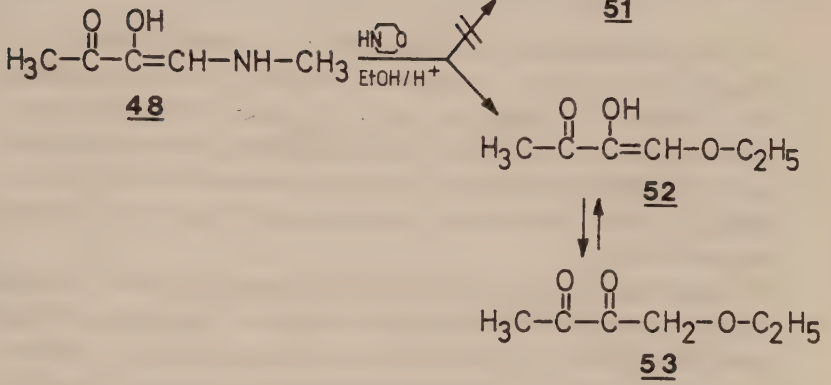
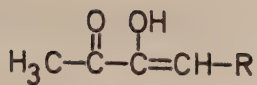


Abb. 1 : NMR-Spektrum von **52** in CDCl_3

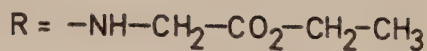
Da kein weiteres Reaktionsprodukt in größeren Mengen isoliert werden konnte, mußte man annehmen, daß unter diesen Bedingungen eine Umaminierung nicht stattfindet. Stattdessen reagiert 48 mit dem Lösungsmittel zum 1-Ethylether des Methylreduktions (52). Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden die weiteren Reaktionen in Dimethylformamid durchgeführt.

Bei der Reaktion des Morpholinoreduktions (51) mit dem Hydrochlorid des Glycinethylesters konnte ich als Hauptprodukt eine Verbindung isolieren, deren Zusammensetzung sich aus Massenspektrum und Elementaranalyse als $C_8H_{13}NO_4$ ergibt. Die Struktur folgt aus den Spektren und kann als C4-Aminoreduktion festgelegt werden, bei dem das Morpholin durch einen Glycinethylesterrest ausgetauscht wurde.

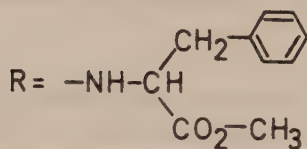
Im NMR-Spektrum kann man die Signale der Ethylestergruppe bei $\delta = 1,40$ ppm (t, 3H, $J=7,0$ Hz) und $\delta = 4,30$ ppm (q, 2H, $J=7,0$ Hz) erkennen. Durch das Wasserstoffatom des Stickstoffs werden die benachbarte Methylenprotonen und das Methinproton zu Dubletts aufgespalten. Für beide Signalgruppen erhält man nach H-D-Austausch Singulets bei $\delta = 4,05$ ppm und $\delta = 6,60$ ppm. Die Lage des Singulets der C-Methylgruppe bei $\delta = 2,25$ ppm ist vergleichbar mit der Lage der Methylgruppen anderer C4-Aminoreduktione. Im IR-Spektrum findet man für die sekundäre Amingruppe eine Bande bei 3350 cm^{-1} und bei 1760 cm^{-1} eine Absorptionsbande der C=O-Estergruppe. Mit anderen Aminosäureestern erhielt ich die entsprechenden C4-Aminosäurereduktione 55 und 56.



54



55



56

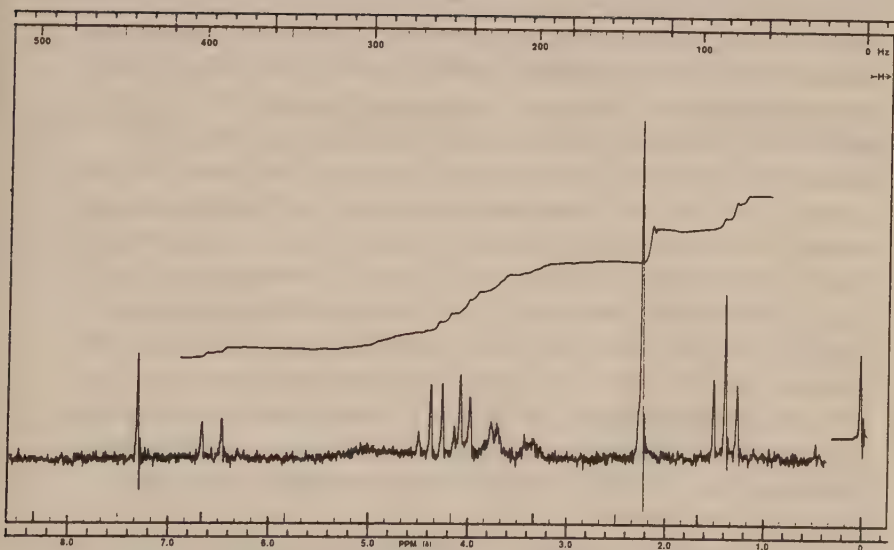
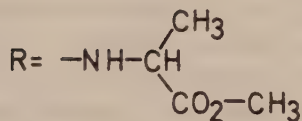


Abb. 2 : NMR-Spektrum von 54 in CDCl_3

3.2.3.2 Umsetzung mit Alkyl- und Arylhydrazinen

Da sich die Aminoreduktone in DMF umaminieren ließen, d.h. mit Nukleophilen gut reagierten, setzte ich sie in weiteren Versuchen mit Alkyl- und Arylhydrazinen um. Da man aber Aminoreduktone auch im Lebensmittel nachweisen wollte, erschien es von Vorteil, diese Derivatisierung in wässriger Lösung durchzuführen.

Ich erwärmte das C4-Methylaminoreduktion (48) mit einer äquimolaren Menge Methylhydrazin in wässriger Lösung (pH=3) bei 80°C. Nach kurzer Reaktionsdauer konnte dünnschichtchromatographisch eine quantitative Umsetzung beobachtet werden. Nach Extraktion der neutralen Lösung mit Methylenchlorid und anschließender fraktionierter Destillation im Hochvakuum erhielt man zwei Reaktionsprodukte, die durch mehrfache HV-Destillation angereichert wurden. Nach Umkristallisation mit Ether konnte ich zwei Verbindungen isolieren, für die sich aus Massenspektrum und Elementaranalyse die gleiche Zusammensetzung $C_5H_8N_2O$ ergibt. Die nahezu identischen Spektren deuten auf isomere Verbindungen hin: das 1,3-Dimethyl- bzw. das 1,5-Dimethyl-4-hydroxypyrazol (58/59). Im NMR-Spektrum haben beide Isomere das N-CH₃-Protonensignal bei $\delta = 3.65$ ppm. Die Lage der C-Methylgruppe und des Ringprotons der isomeren Pyrazole unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. An Hand der vorliegenden Spektraldaten ist es nicht möglich, die Struktur der beiden Isomeren zuzuordnen.

Immerhin kann auf Grund der NMR-Spektren die Bildung der tautomeren 4-Pyrazolinone 57a und 57b ausgeschlossen werden,

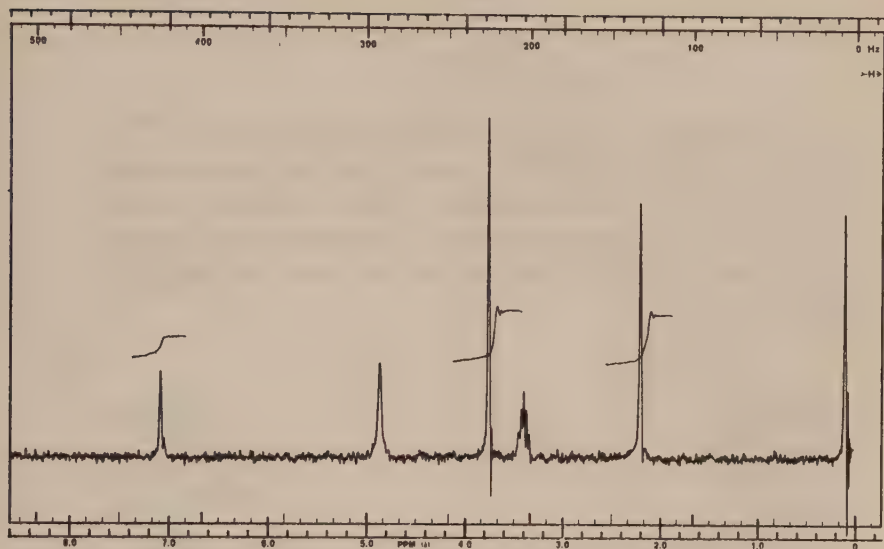


Abb. 3 : NMR-Spektrum von 58 in CD₃OD

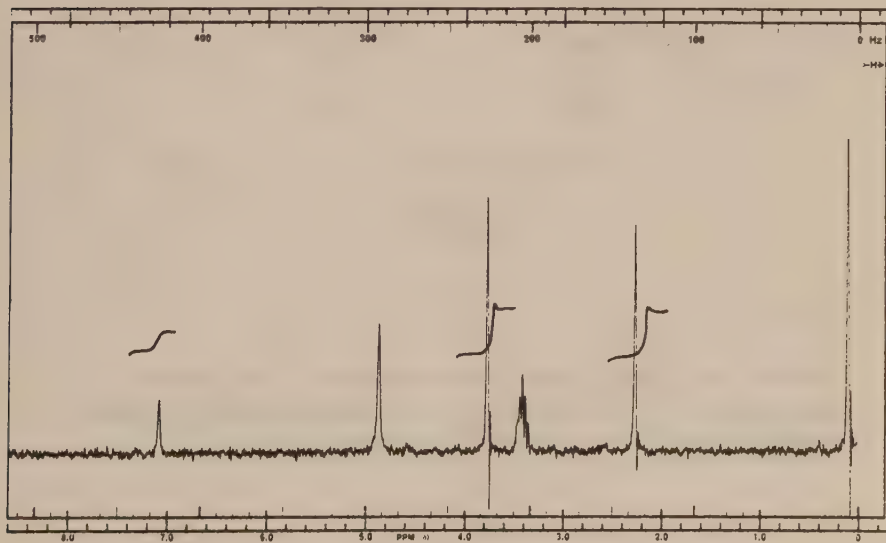
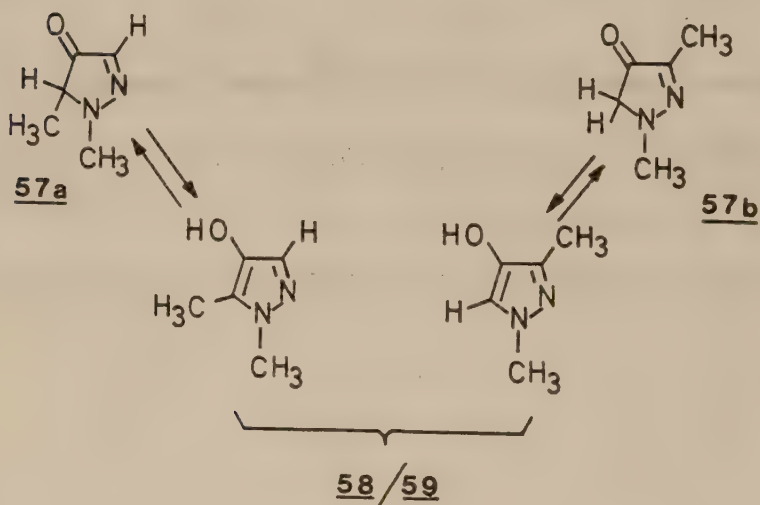
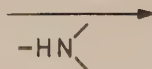
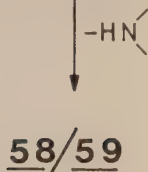
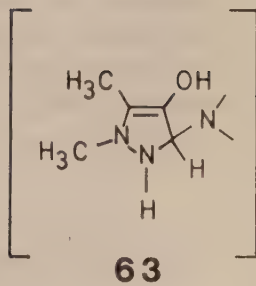
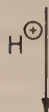
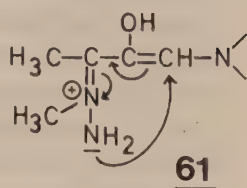
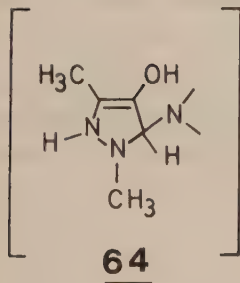
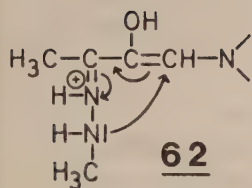
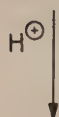
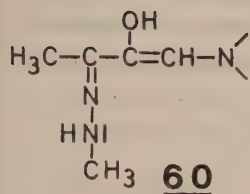


Abb. 4 : NMR-Spektrum von 59 in CD₃OD

was mit Beobachtungen von Sabaté-Alduy und Bastide ³¹ übereinstimmt. Sie konnten zeigen, daß 3(5)-Hydroxypyrazole meist als 3(5)-Pyrazolone in der Ketoform vorliegen, während bei 4-Hydroxypyrazolen, unabhängig vom Lösungsmittel und den Substituenten, nur die Enolform gebildet wird.



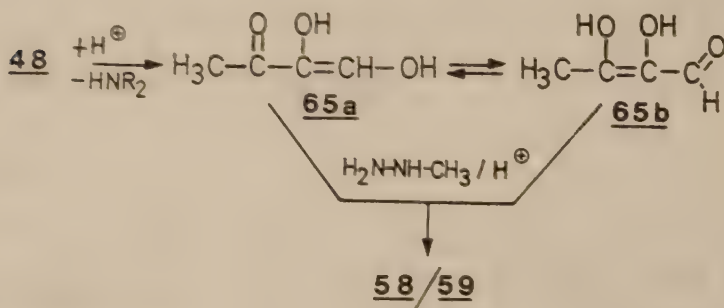
Gestützt auf verschiedene Untersuchungen von Coispeau und Elguero ³² läßt sich für die Pyrazolbildung folgender Reaktionsmechanismus formulieren (Schema F):



SCHEMA F

Bei der Umsetzung des C4-Aminoreduktens mit monosubstituiertem Hydrazin kann sich zuerst das Hydrazon bilden, das im Säuren unter Protonenkatalyse cyclisiert. Die Abspaltung des Aminrestes wird durch die Bildung eines aromatischen Ringsystems begünstigt. Man erhält das 1,3-Dimethyl-4-hydroxypyrazol. Das isomere 1,5-Dimethyl-4-hydroxypyrazol entsteht nach Kondensation des α -Stickstoffatoms des Hydrazins über die Zwischenstufe 61 und anschließender Cyclisierung im Säuren in analoger Weise.

Neben dem in Schema F formulierten Angriff des Methylhydrazins am Carbonyl-C-Atom kann der Primärschritt selbstverständlich auch am C4-Atom des Reduktens stattfinden. Andererseits könnte, bevor es zur Hydrazonbildung kommt, Hydrolyse zum sauerstoffanalogen Methylreduktion (65) eintreten (Simon, Heubach²³). In diesem Fall reagiert dann das Methylhydrazin mit den im Gleichgewicht vorhandenen Tautomeren 65a und 65b (Schank, Wessling³⁰) zu den Hydroxypyrazolen 58/59.



Gaschromatographisch lassen sich die beiden Isomeren 58/59 gut trennen. Die Untersuchungen zeigten, daß das Verhältnis, in dem die beiden Hydroxypyrazole 58/59 gebildet werden, konstant ist. Man erhält sie etwa im Verhältnis 1:1, unabhängig davon, ob man bei der Reaktion von C4-Aminoreduktonen mit primärem oder sekundärem Aminrest ausgeht.

Durch die Umsetzung zu Hydroxypyrazolen war eine gute analytische Nachweismethode für C4-Aminoreduktone gefunden. Variationsmöglichkeiten bieten sich an, indem man das Aminoreduktion auch mit anderen monosubstituierten Hydrazinen umsetzt. Wie bei der Reaktion mit Methylhydrazin sollte man mit den verschiedenen Hydrazinen die entsprechenden N-substituierten Hydroxypyrazole erhalten.

Ich setzte zu diesem Zweck das Morpholinoreduktion (51) im Wässrigen mit einer äquimolaren Menge Phenylhydrazin um. Nach Zugabe einiger Tropfen Salzsäure ließ ich die Lösung bei leicht saurem pH-Wert einige Stunden bei Raumtemperatur rühren. Nach Neutralisation und Extraktion mit Methylenchlorid wurde der Extrakt im Hochvakuum destilliert. Ich erhielt ein farbloses Öl, das nach einiger Zeit in der Brücke auskristallisierte. Der Molekülpeak des Massenspektrums zeigte das Molekulargewicht 174; im IR-Spektrum deuten zwei charakteristische C=N-Absorptionsbanden im Bereich von 1600 cm^{-1} darauf hin, daß zwei isomere Hydroxypyrazole entstanden sind. (Weitere Spektraldaten siehe experimenteller Teil.)

Aus der Integration der NMR-Signale und der gaschromatographischen Bestimmung kann man deutlich erkennen, daß eines der beiden Isomeren in viel größerer Menge gebildet

wird. Man könnte vermuten, daß auf Grund der sterischen Wechselwirkung bevorzugt das Hydroxypyrazol gebildet wird, bei dem die beiden voluminösen Gruppen, d.h. der Methyl- und der Phenylrest, am weitesten voneinander entfernt sind. Doch auch hier ist an Hand der vorhandenen Spektren keine eindeutige Zuordnung möglich. Die Strukturen können nur durch weitere Untersuchungen eindeutig zugeordnet werden.

Mit Benzyl- bzw. Propylhydraziniumoxalat erhielt ich unter gleichen Bedingungen wiederum beide Isomere und zwar 67/67a bzw. 68/68a im Mengenverhältnis von etwa 1:1.

Die Flüchtigkeit der verschiedenen N-substituierten Hydroxypyrazole reichte zur gaschromatographischen Bestimmung aus. Die Retentionszeiten für die verschiedenen Hydroxypyrazole sind abhängig von der Größe ihrer Substituenten (Tabelle 1). Somit kann man, auch bei gleichzeitiger Anwesenheit störender Substanzen, durch geeignete Wahl des Hydrazins den GC-Nachweis des C4-Aminoreduktens variieren.

3.3 GC-Bestimmung der C4-Aminoreduktone als Hydroxypyrazole

3.3.1 Ausarbeitung einer Nachweismethode

Da sich die C4-Aminoreduktone mit Hydrazin in wässriger Lösung in guten Ausbeuten zu Hydroxypyrazolen umsetzen ließen, sollte nun geprüft werden, ob mit dieser Reaktion der Nachweis von Aminoreduktonen in Zucker-Aminosäure-Bräunungsgemischen möglich ist. Bei den weiteren Unter-

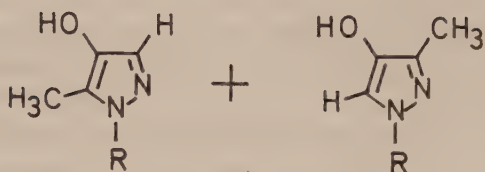
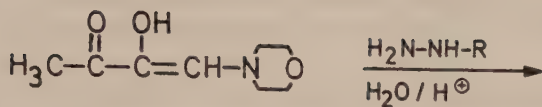


Tabelle 1 GC-Bestimmung substituierter N-Hydroxypyrazole

R		Retentionszeiten [min] ⁺	
-CH ₃	<u>58</u> / <u>59</u>	11,25	13,75
	<u>66</u> / <u>66a</u>	21,50	24,80
-CH ₂ - 	<u>67</u> / <u>67a</u>	23,10	23,70
-C ₃ H ₇	<u>68</u> / <u>68a</u>	16,00	17,75

+ Säulenmaterial siehe experimenteller Teil

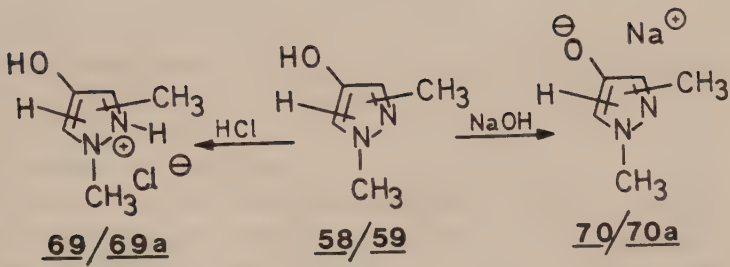
suchungen beschränkte ich mich auf die Umsetzung mit Methylhydrazin, das mit Wasser gut mischbar ist, und mir aus diesem Grund für eine quantitative Umsetzung geeignet erschien.

Ich erwärmte eine Glucose-Glycin-Lösung (1:1) 4h auf 80°C. Die lipophilen, niedermolekularen Zuckerabbauprodukte ließen sich mit Methylenchlorid extrahieren, während das C4-Glycinoreduktion als polare Verbindung im Wässrigen zurückblieb. Danach wurde das Bräunungsgemisch mit Methylhydrazin/HCl versetzt und wie bei den Modellversuchen aufgearbeitet.

Bei der anschließenden Trennung und Identifizierung einzelner Komponenten des Methylenchloridextraktes im GC-MS-System konnten die beiden Hydroxypyrazole 58/59 nachgewiesen werden. Da andere leichtflüchtige Verbindungen eine quantitative Aussage störten, war es notwendig, diese Verbindungen vor der GC-Bestimmung abzutrennen.

Eine Möglichkeit hierzu bietet die Eigenschaft der Hydroxypyrazole im Sauren und Alkalischen Salze zu bilden. In verdünnter alkalischer Lösung wird die Hydroxylgruppe, die in ihrer Acidität etwa der der Phenole vergleichbar ist, deprotoniert, während das Stickstoffatom in 2-Stellung mit seinem freien Elektronenpaar für die basischen Eigenschaften von 58/59 verantwortlich ist.

Mit HCl in THF erhält man aus 58/59 die Hydrochloride 69/69a. Mit Laugen können daraus die Hydroxypyrazole wieder freigesetzt und aus neutraler, wässriger Lösung mit Methylenchlorid extrahiert werden.



Auf diese Weise sollte es also möglich sein, auch im Zucker-Amin-Extrakt störende Substanzen durch Extraktion im Sauren und Basischen abzutrennen.

Das nach der Reaktion mit Methylhydrazin extrahierte ölige

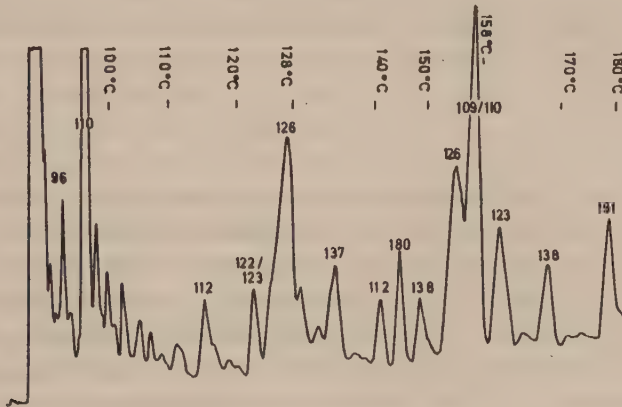


Abb. 5 : Nachweis von C4-Aminoreduktionen z.B. in Malzextrakt (siehe auch 3.3.4); GC-Bestimmung nach Umsetzung eines Malzextraktes mit Methylhydrazin

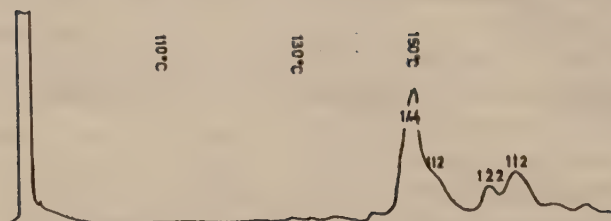


Abb. 5b : Gaschromatogramm des Malzextraktes, vergl. Abb.5a
nach Extraktion im Sauren und Basischen

Gemisch wurde in Wasser gelöst und anschließend zunächst im Basischen, dann im Sauren mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach Neutralisation und erneuter Extraktion konnten 58/59, wie Abb. 5b zeigt, gut gaschromatographisch nachgewiesen werden. Das Chromatogramm Abb. 5a zeigt im Vergleich dazu ganz deutlich, wie viele störende Begleit-substanzen durch diese zusätzlichen Reinigungsschritte abgetrennt werden.

3.3.2 Blindversuche und Überprüfung der Nachweismethode

Um zu sehen, wie gut sich die ausgearbeitete Methode für eine quantitative Bestimmung der C4-Aminoreduktone eignet, wurde ein Wiederfindungsversuch durchgeführt. Hierzu wurden 15,6 mg Morpholinoreduktion (51) in einem Liter Wasser gelöst. Diese Lösung setzte ich mit Methylhydrazin um. Nach Neutralisation und Extraktion mit Methylenchlorid ließen sich bei der anschließenden GC-Bestimmung 8 mg ($\hat{=}$ 8 ppm) der Hydroxypyrazole 58/59 nachweisen, während eine quantitative Umsetzung einer Ausbeute von 10 ppm entsprochen hätte. Für die anschließenden Reinigungsschritte konnte ich einen Verlust von weniger als 5% berechnen. (Einzelheiten siehe experimenteller Teil.)

Daß mit dieser Methode eine recht gute quantitative Aussage möglich ist, zeigt auch der Vergleich der indirekten mit der direkten Bestimmung des Reduktons (Tabelle 2). Ich bestimmte die Menge des C4-Methylaminoreduktions eines Glucose-Methylamin-Bräunungsgemisches einmal nach Reaktion mit Methylhydrazin über die Hydroxypyrazole, zum anderen nach Extraktion mit Methylenchlorid und säulenchromatographischer Vorreinigung direkt im Gaschromatographen. Zusätzlich ließ ich das Aminoreduktion aus solch einem gereinigten Extrakt auskristallisieren und führte eine Gewichtsbestimmung durch.

Die Werte der Tabelle 2 zeigen, daß man bei einer direkten quantitativen Bestimmung des C4-Methylaminoreduktions (48) mit größeren Verlusten rechnen muß. Bei der indirekten Nachweismethode über die Hydroxypyrazole 58 und 59 haben

Tabelle 2

Bestimmung von <u>48</u> durch	mg/Mol Glucose
indirekte GC-Bestimmung über <u>58</u> und <u>59</u>	126
direkte GC-Bestimmung von <u>48</u>	102
auswiegen von <u>48</u>	150

die vorangegangenen Versuche gezeigt, daß etwa 80% der tatsächlich vorhandenen Menge erfaßt werden. Damit erhält man einen Wert von 157,5 mg (anstelle von 126 mg!) und eine recht gute Übereinstimmung mit der gravimetrisch bestimmten Menge von 150 mg/Mol Glucose.

Da die Zucker-Amin-Bräunungsgemische nach Zugabe des Methylhydrazins auf eine Temperatur von 80°C erwärmt werden, könnte es auch in diesem Zeitraum zu einer Bildung von Aminoreduktionen der Struktur 48 kommen. Neben dem

Amin könnte auch das Methylhydrazin als Aminkomponente reagieren und das entsprechende C4-Hydrazinoreduktion bilden. Doch ist unter den gegebenen Bedingungen (bei stark saurem pH-Wert) eine Reduktionbildung nicht zu erwarten. Um dies zu überprüfen wurde der folgende Blindversuch durchgeführt.

Dazu wurde eine wässrige Lösung von Glucose (1,8 kg) und Glycin (1:1) mit Methylhydrazin umgesetzt und dies nach Ende der Reaktionszeit entsprechend der ausgearbeiteten Methode aufgearbeitet. Die GC-Bestimmung zeigte, daß weniger als 1 µg der Hydroxypyrazole aus 1,8 kg Glucose entstehen. Das entspricht bezogen auf die Menge des eingesetzten Zuckers weniger als 1 ppb.

3.3.3 Nachweis in Bräunungsgemischen von Mono- und Disacchariden

Verschiedene Zucker wurden in wässriger Lösung mit Glycin bei unterschiedlichen Temperaturen umgesetzt und der Gehalt des C4-Glycinoreduktion über die Hydroxypyrazole gaschromatographisch bestimmt. In Tabelle 3 sind die für das Aminoreduktion erhaltenen Werte in Abhängigkeit von Temperatur und Zucker zusammengestellt. Dabei konnte ich feststellen, daß das C4-Glycinoreduktion aus Monosacchariden in wesentlich größeren Mengen entsteht als aus Disacchariden. Zusätzlich kann man sagen, daß die Bildung von der Temperatur abhängig ist, der das Bräunungsgemisch ausgesetzt

Tabelle 3 Gehalt an C4-Reduktonen (bestimmt über die Hydroxypyrazole 58/59) in Zucker-Glycin-Reaktionsgemischen (Erhitzungsdauer 4h)

Temperatur	Glucose	Fructose	Saccharose	Maltose	Lactose
40°C		-			
60°C		2,2			
80°C	1,4	3,1			
100°C		5,7	0.105	0.016	(+)

in mg 58/59 / Mol Zucker

wird. Während man für Disaccharide bei einer Temperatur von 100°C Werte im ppb-Bereich erhält, die mit dieser Methode gerade noch nachweisbar sind, ist eine Reaktion zu C4-Aminoreduktonen bei Monosacchariden auch noch bei Temperaturen von 60°C zu beobachten.

Vergleicht man die Menge des C4-Glycinoreduktons (Tab. 3) mit der Menge des unter gleichen Bedingungen aus Glucose gebildeten C4-Methylaminoreduktons (Tab. 2) muß man annehmen, daß der Abbau zu Aminoreduktonen auch von der vor-

handenen Aminkomponente beeinflußt wird.

3.3.4 Nachweis des C4-Aminoreduktions in Malzextrakt

Reduktone, die während der Herstellung von Lebensmitteln durch Maillard Reaktionen entstehen, werden für die Stabilität zahlreicher Nahrungsmittel verantwortlich gemacht. Zum Beispiel wird die Haltbarkeit und Geschmacksstabilität von Bier durch die Bildung von reduzierenden Substanzen erklärt, die entweder beim Darren des Malzes oder beim anschließenden Kochen der Würze entstehen und dann auf diesem Wege in den Biersud gelangen.

In der Literatur werden die dabei entstehenden Reduktone nicht näher charakterisiert. Die vorgestellte Methode ermöglicht es, speziell das C4-Aminoreduktion in diesen komplexen Mischungen nachzuweisen.

Aus arbeitstechnischen Gründen verwendete ich Malzextrakt. Natürlich muß man berücksichtigen, daß sich die temperatur- und oxidationsempfindlichen Reduktone schon während des Herstellungsprozesses zersetzt haben könnten.

Trotzdem konnte ich nachweisen, daß C4-Aminoreduktone, wenn auch in sehr geringer Konzentration, vorliegen. Ich errechnete nach gaschromatographischer Bestimmung (über die Hydroxypyrazole) eine Menge von 0.043 ppm an Aminoreduktion, bezogen auf die eingesetzte Menge von 1,75 kg Malzextrakt.

3.4 Isolierung weiterer Hydroxypyrazole aus Bräunungs- gemischen

Bei der Aufarbeitung eines Glucose-Methylamin-Bräunungs-
gemisches, dem Methylhydrazin zugegeben wurde, und in dem das
C4-Aminoreduktion in Form der Hydroxypyrazole vorliegt,
konnte bei der Hochvakuumdestillation neben 58/59 eine wei-
tere kristalline Verbindung isoliert werden. Das NMR-Spek-
trum zeigt zwei C-Methylgruppen bei $\delta = 2.30$ ppm (s,3H)
und $\delta = 2.47$ ppm (s,3H), sowie ein Singulett bei
 $\delta = 3.97$ ppm, das der chemischen Verschiebung nach einer
N-CH₃-Gruppe entspricht, wie wir sie bei den Pyrazolen be-
obachten konnten. Aus dem Molekülpeak des Massenspektrums

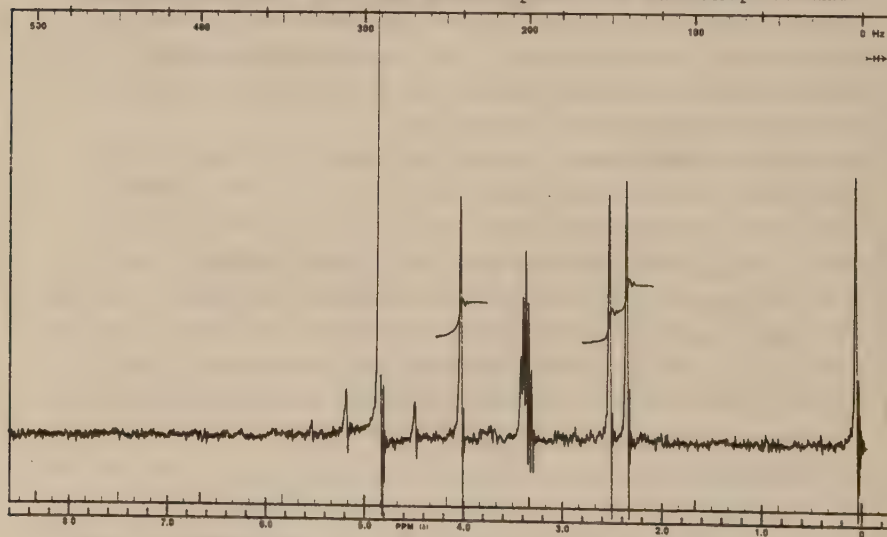
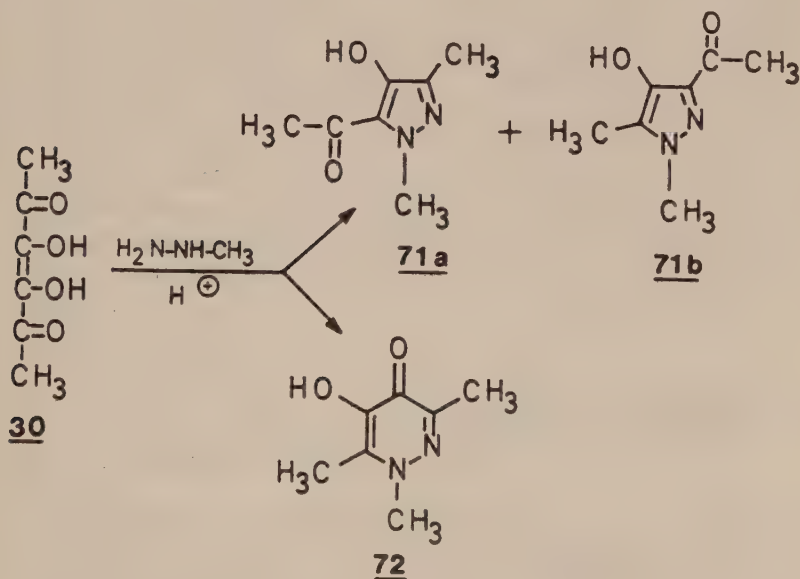


Abb. 6 : NMR-Spektrum von 71a,b bzw. 72 in CD₃OD

erhält man für diese Verbindung ein Molekulargewicht von 154, das IR-Spektrum zeigt im Doppelbindungsbereich eine verbreiterte Bande bei 1570 cm^{-1} . Die Vermutung, daß als reaktives Zwischenprodukt der Maillard Reaktion das Diacetylformoin mit Methylhydrazin zu dem isolierten Produkt reagiert, konnte durch eine unabhängig davon durchgeführte Synthese bestätigt werden.

Aus den Spektraldaten (IR,MS,NMR) ist allerdings nicht ersichtlich, ob 30 mit Methylhydrazin das entsprechende Py-



razol 71a,b bildet, oder als 1,4-Diketoverbindung mit dem Hydrazin zum Pyridazinon 72 reagiert. Die genaue Struktur könnte nur durch weitere Untersuchungen exakt festgelegt werden.

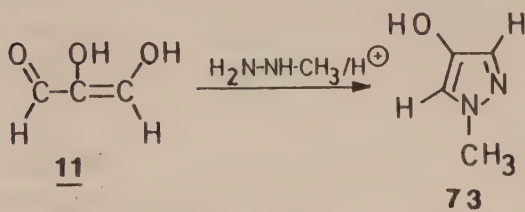
Das Diacetylformoin spielt als reaktive Zwischenstufe bei der thermischen Zuckerumwandlung vermutlich eine wichtige Rolle. Auch Tatum und Jurch¹³ konnten 30 in Glucose-Methylamin-Bräunungsgemischen nachweisen, allerdings nur in geringen Mengen. Ein Grund dafür ist wohl die Reaktivität dieser Verbindung, die leicht zu Folgeprodukten weiterreagiert und deren quantitative Bestimmung deswegen Schwierigkeiten bereitet. Wenn es aber gelingt, aus dem Diacetylformoin im Wässrigen ein stabiles Derivat herzustellen, müßte eine quantitative Aussage möglich sein, ohne daß diese durch Isolierungs- oder Reinigungsschritte verfälscht wird. Hierfür bietet sich die Umsetzung mit Methylhydrazin an. Man erhält ein stabiles extrahierbares Reaktionsprodukt, das sich im Hochvakuum bei 130°C/0.1 Torr sublimieren und in freier Form isolieren läßt.

3.5 Anwendung der Nachweismethode auf andere bekannte Reduktone aus Zuckern

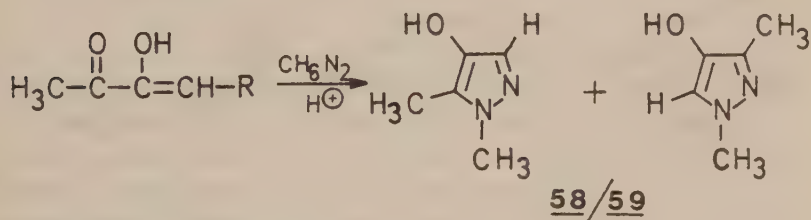
Da man nicht nur aus den C4-Aminoreduktionen, sondern auch aus dem Diacetylformoin (30) mit Methylhydrazin ein stabiles Reaktionsprodukt erhält, müßte eine Derivatisierung anderer Verbindungen mit Reduktonstruktur auf die gleiche

Weise möglich sein.

Aus diesem Grund synthetisierte ich nach einer Vorschrift von Euler ² das Trioseredukton (11) und setzte es in saurer, wässriger Lösung mit Methylhydrazin um. Nach Extraktion der neutralen Lösung mit Methylenchlorid erhielt ich nach Hochvakuumsublimation das kristalline 1-Methyl-4-hydroxypyrazol (73) . (Spektraldaten siehe experimenteller Teil.)



Auch aus dem Methylreduktion (65) und dem 1-Ethylether des Methylreduktion (52) erhielt ich wie erwartet als Reaktions-



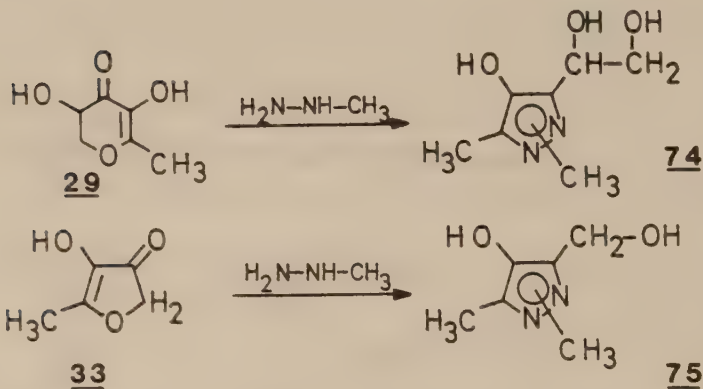
65 R = -OH

52 R = -O-C₂H₅

produkte wieder die beiden Hydroxypyrazole 58/59.

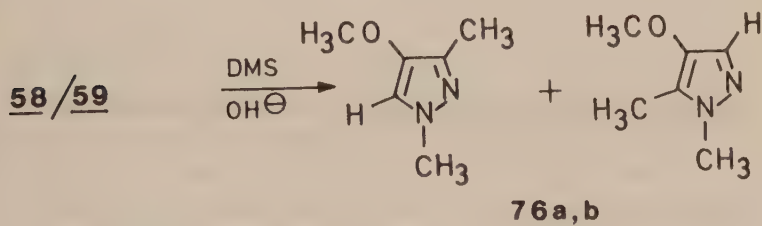
Bei den beiden cyclischen Reduktonethern, dem 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranon (29) und dem 4-Hydroxy-5-methyl-2,3-dihydrofuran-3-on (33), war eine Reaktion in saurem Milieu nicht zu beobachten. Erst im schwach Alkalischen kam es zur Reaktion mit Methylhydrazin und unter Ringöffnung bildeten sich die entsprechenden 4-Hydroxypyrazole 74 und 75.

Von den beiden Isomeren konnte jeweils eines in kristalliner Form isoliert werden.



3.6 Methylierung der Hydroxypyrazole

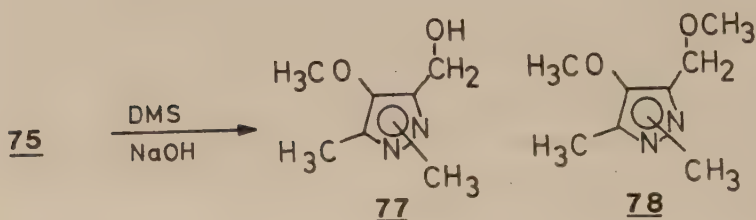
Die beiden Hydroxypyrazole 74 und 75 können auf Grund ihres polaren Charakters mit organischen Lösungsmitteln nicht mehr extrahiert werden. Um eine Isolierung dennoch zu ermöglichen, wurde die OH-Gruppe der Pyrazole mit Dimethylsulfat in wässriger, alkalischer Lösung methyliert. Unter diesen Bedingungen erhielt ich aus dem Gemisch der Dimethyl-4-hydroxypyrazole 58/59 die entsprechenden Dimethyl-4-methoxy-pyrazole 76a/76b die an Hand der verschiedenen Spektren identifiziert wurden.



Eine gaschromatographische Ausbeutebestimmung zeigte, daß die Umsetzung aber nicht quantitativ verlief und nur 40% der Hydroxypyrazole unter den von mir angewandten Bedingungen zu den O-Methylethern 76a,b reagierten.

Der Versuch, das Hydroxypyrazol 75 mit DMS/NaOH zu methylieren brachte noch schlechtere Ergebnisse. Ich isolierte sowohl den Mono- als auch den Dimethylether 77 bzw. 78 .

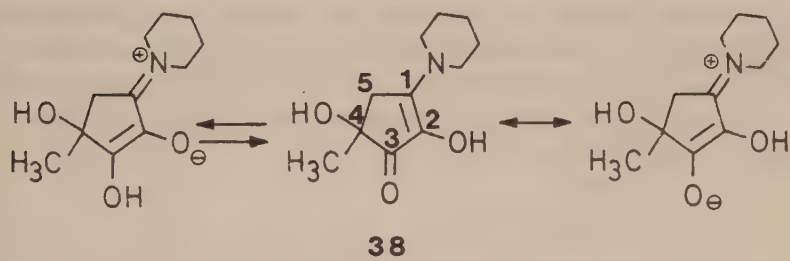
Beide Umsetzungsprodukte wurden nach fraktionierter Hochvakuumdestillation in geringen Mengen als Öle erhalten.



3.7 Derivatisierung des Piperidino-Hexose-Reduktions (38)

Die offenkettigen Reduktone, das Trioseredukton (11), das Methylreduktion (65), die verschiedenen C4-Aminoreduktone, sowie die beiden Reduktonether 29 und 33 reagieren mit Methylhydrazin zu Hydroxypyrazolen. In weiteren Versuchen sollte geprüft werden, ob mit Methylhydrazin auch eine Derivatisierung des Amino-Hexose-Reduktions (38) möglich ist. Hodge und Fischer, sowie Weygand und Mitarbeiter ²³, führten umfassende Untersuchungen durch, um die Struktur von 38 festzulegen. Da sich die Hydroxylgruppe am C₃-Kohlenstoffatom weder methylieren noch acetylieren ließ, und auch mit Carbonylreagentien keine Reaktion zeigte,

folgerten sie, daß das Redukton 38 als inneres Salz mit zwitterionischer Struktur vorliegt.



Bei der Umsetzung von 38 mit dem Hydrochlorid des Phenylhydrazins erhielten sie in guten Ausbeuten (97% d.Th.) ein tiefgelbes Reaktionsprodukt der Zusammensetzung $C_{12}H_{12}N_2O_2$, ohne dessen Struktur genau festlegen zu können.

Um zu klären, welcher Verbindungstyp bei der Reaktion mit Hydrazinen entsteht, erwärmte ich eine wässrige, salzsaure Lösung des Piperidino-Hexose-Reduktons mit Methylhydrazin. Ich isolierte ein nicht sehr stabiles, schwach gelbes Hauptprodukt, das in Methanol/ H_2O eine blaue Eisen(III)-chlorid-Reaktion gibt.

Im NMR-Spektrum fehlen die für den Piperidinrest charakteristischen Signale. Das Dublett bei $\delta = 3,20$ ppm erscheint nach D_2O -Austausch im Spektrum als Singulett und muß in Verbindung mit dem verbreiterten Signal bei $\delta = 10,37$ ppm

der $\text{-NH-CH}_3\text{-}$ Gruppe eines Hydrazons zugeordnet werden. Die leicht verbreiterten Signale bei $\delta = 2.04$ ppm und $\delta = 2.93$ ppm sind mit geringer Kopplungskonstante zu einem Quartett bzw. einem Triplet aufgespalten. Aus der Integration der Signale ergibt sich eine Methyl- und eine Methylengruppe. Die schwache Aufspaltung durch eine sogenannte long-range-Spin-Spin-Kopplung, deutet darauf hin, daß sowohl die $\text{CH}_3\text{-}$ als auch die $\text{-CH}_2\text{-}$ Gruppe an dem gleichen olefinischen C-Atom gebunden sind.

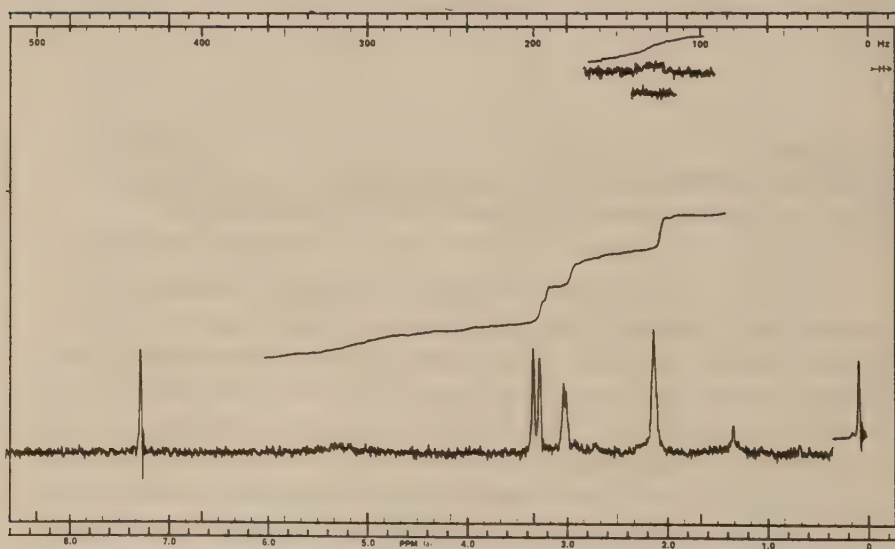
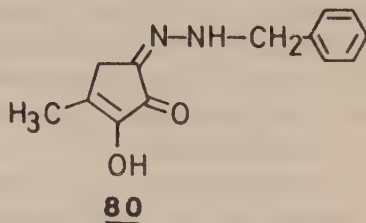
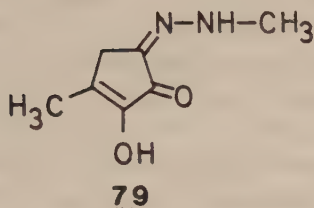


Abb. 7 : NMR-Spektrum von 79 in CDCl_3

Auf Grund der Spektraldaten und des Molekülpeaks des Massenspektrums (M^+ 154) kann für diese Verbindung die Struktur 79 formuliert werden.



Mit Benzylhydrazin als Reaktionspartner des Piperidino-Hexose-Reduktons erhielt ich unter analogen Bedingungen das entsprechende Benzylhydrazin-Derivat 80, das aus dem wässrigen Reaktionsgemisch ausfiel und in guten Ausbeuten isoliert werden konnte.

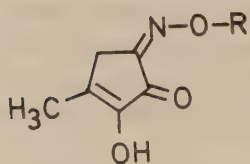
79 genauso wie auch 80 sind instabile, temperatur- und oxidationsempfindliche Derivate, die sich bei Raumtemperatur zersetzen.

Im Gegensatz dazu bildet das Amino-Hexose-Redukton mit verschiedenen O-Alkylhydroxylaminen stabile Oxime. Dies war um so erstaunlicher, da der Versuch, das C4-Aminoredukton unter gleichen Reaktionsbedingungen mit Hydroxylaminen zu Isoxazolen umzusetzen, zu keinen definierten Produkten führte.

Zur Derivatisierung erhitzte ich 38 mit dem Hydrochlorid

des Hydroxylamins und anderen O-substituierten Hydroxylaminen in wässriger oder methanolischer Lösung am Rückfluß. Die Reaktionsprodukte konnten mit Ether aus der sauren, wässrigen Lösung isoliert werden. Charakteristisch für diese Oxime ist auch hier eine durch eine "long-range"-Spin-Spin-Kopplung hervorgerufene Aufspaltung der Signale des $\text{H}_3\text{C}-\text{C}^{\text{H}}-\text{CH}_2$ -Strukturelements bei $\delta = 2,02$ ppm und $\delta = 3,10$ ppm. Die IR-Spektren dieser Verbindungen zeigen drei fast identische Absorptionsbanden im Bereich von $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$.

In Übereinstimmung mit dem Molekülpeak der Massenspektren ergeben sich für diese Verbindungen folgende Strukturen:



81 $\text{R} = -\text{H}$

82 $\text{R} = -\text{CH}_3$

83 $\text{R} = -\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$

Da die Oxime auf einfache Weise isoliert werden können und gaschromatographisch auf verschiedenen handelsüblichen Säulen bestimmbar sind, eignen sie sich gut für einen analytischen Nachweis des Amino-Hexose-Reduktions.

4. Abbauprodukte des Piperidino-Hexose-Reduktions (38)

4.1 Isolierung der Hydrolyseprodukte

Aus Glucose-Piperidin-Bräunungsgemischen kann das Piperidino-Hexose-Reduktion (38) in Ausbeuten bis zu 30% isoliert werden. Demgegenüber ist ein Reduktion der Struktur 38 mit primärem Aminrest in der Literatur nicht beschrieben. Da aber im Lebensmittel überwiegend primäre Amine als Reaktionspartner der Kohlenhydrate zur Verfügung stehen, kann man erwarten, daß sich auch diese Aminoreduktone im Verlaufe der Maillard Reaktion in größeren Mengen bilden. Ich setzte das Piperidino-Hexose-Reduktion (38) in salzsaurer wässriger Lösung mit Glycinethylester um. Nach kurzer Reaktionsdauer zeigte die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches zwei neu entstandene Substanzflecken, die sich beim Besprühen mit Eisen(III)-chloridlösung blau färbten. Beide Umsetzungsprodukte lassen sich aus saurer Lösung mit Ether extrahieren. Durch anschließende fraktionierte Sublimation im Hochvakuum konnte ich das Hauptprodukt dieser Umsetzung in kristalliner Form isolieren. Aus Massenspektrum und Elementaranalyse ergibt sich die Zusammensetzung $C_6H_6O_3$; was bedeutet, daß nicht, wie man vermutet hatte, das Kondensationsprodukt aus Hexose-Reduktion und Amin entstanden ist: Weitere Versuche zeigten, daß die gleichen Produkte auch ohne Amin als Reaktionspartner entstehen.

An Hand der Spektraldaten kann die Verbindung als De-

Hydrierungsprodukt der Methylreduktinsäure (84) aufgefaßt werden. Wichtige Hinweise zur Struktur der als Methylreduktinsäure (85) bezeichneten Verbindung liefert das NMR-Spektrum.

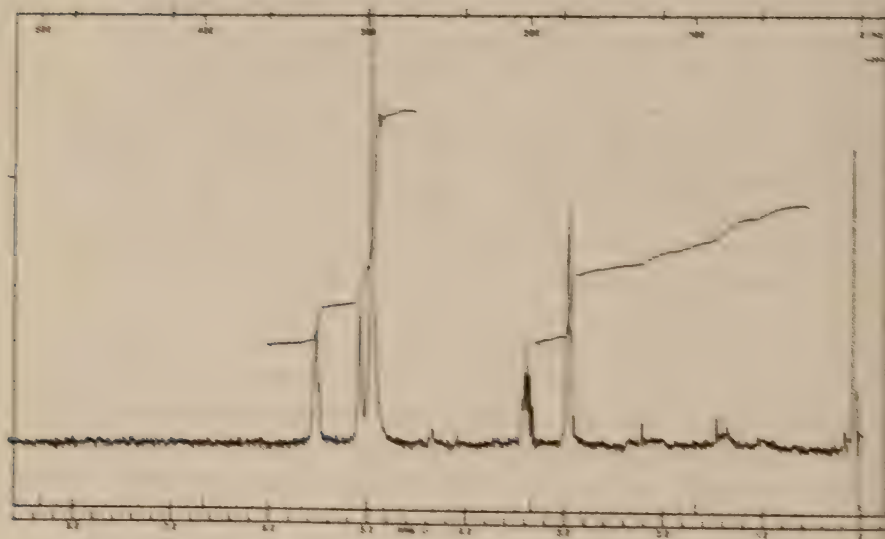
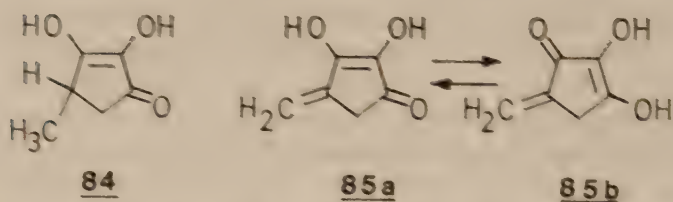
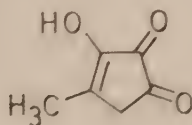


Abb. 8 : NMR-Spektrum von 85 in CD_3OD

Das mit geringer Kopplungskonstante zu einem Doppeldublett aufgespaltene Signal bei $\delta = 2,88$ ppm entspricht einer cyclischen $-\text{CH}_2-$ -Gruppe, die mit zwei Protonen einer exocyclischen Doppelbindung koppelt. Durch die räumliche Anordnung sind die Methylenprotonen der exocyclischen Doppelbindung nicht mehr identisch, und man erhält im NMP-Spektrum zwei Signale mit verschiedener chemischer Verschiebung bei $\delta = 5,00$ ppm und $\delta = 5,43$ ppm. Im IR-Spektrum erkennt man eine schwache Absorptionsbande bei 1670 cm^{-1} und zwei etwas verbreiterte Banden bei 1610 cm^{-1} und 1560 cm^{-1} .

Das zweite Reaktionsprodukt, das bei der Hydrolyse des Piperidino-Hexose-Reduktens in geringerer Menge entsteht, isolierte ich in reiner Form nach säulenchromatographischer Vortrennung und anschließender Sublimation im Hochvakuum. Für diese tiefgelbe kristalline Verbindung ergibt sich aus Elementaranalyse und Massenspektrum die mit 85 identische Zusammensetzung $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$. Die weiteren Spektren zeigen, daß es sich um die zur Methylenreduktinsäure isomeren Diketo-verbindung 86 handelt.



86

Das NMR-Spektrum liefert wertvolle Strukturhinweise. Die Protonen der Methylen- und C-Methylgruppe unterliegen einer "long-range"-Spin-Spin-Kopplung. Das mit 0,5 Hz zu einem Triplet aufgespaltene Signal bei $\delta = 2,3$ ppm ist einer CH_3 -Gruppe, das Signal bei $\delta = 3,05$ ppm (q, 2H, $J=0,5$ Hz) einer Methylengruppe zuzuordnen. Das IR-Spektrum zeigt scharfe Banden bei 1780 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} und 1645 cm^{-1} .

Wurde die Hydrolyse nicht nach wenigen Minuten abgebrochen bildete sich zusätzlich ein dimeres Produkt, das mit der von Hodge und Mills ³³ bei der sauren Hydrolyse des Piperidino-Hexose-Reduktions isolierten Verbindung 87 identisch ist.

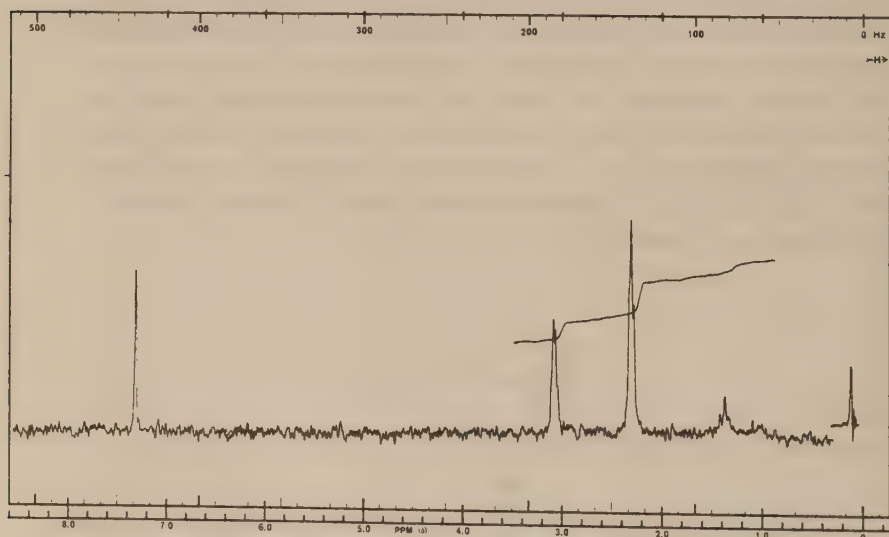
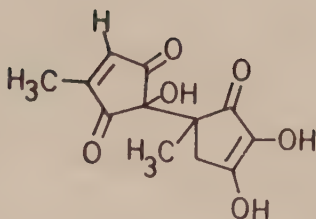
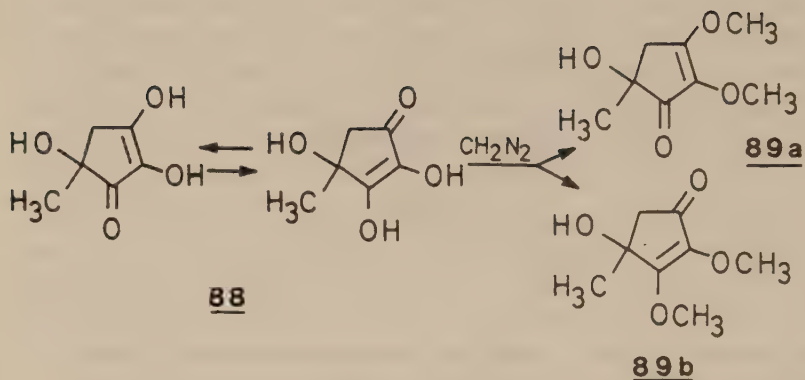


Abb. 9 : NMR-Spektrum von 86 in CDCl_3



87

Nach Abtrennung der lipophilen Hydrolyseprodukte 85, 86 und 87 mit Ether oder Methylenchlorid erhielt ich nach Essigesterextraktion ein weiteres Umsetzungsprodukt, das mit Eisen(III)-chlorid eine intensive blaue Farbreaktion zeigte. Die Reinigung bereitete Schwierigkeiten, da beim Eindampfen des Lösungsmittels offensichtlich Zersetzung eintrat, und gelang erst nach Methylierung mit Diazomethan. Bei der anschließenden Trennung deuten zwei Peaks mit identischer Masse darauf hin, daß es sich um ein Gemisch zweier isomerer Methylether handelt. Dies steht in Analogie zu den von Hesse et al.³⁴ durchgeführten Untersuchungen, die zeigten, daß die verschiedenen tautomeren Formen der Methylreduktinsäure (84) in Lösung nicht nachweisbar sind, und erst nach geeigneter Derivatisierung eine Trennung der beiden Isomeren möglich ist. Das NMR-Spektrum des Gemisches zeigt dann auch ganz deutlich die durch Methylgruppen fixierten tautomeren Formen 89a und 89b des Reduktions 88.



4.2 Eigenschaften von 85 und 86

Im Falle der Methylenreduktinsäure **85** wird im Gleichgewicht vermutlich die Struktur überwiegen, bei der die exocyclische Doppelbindung das konjugierte Bindungssystem verlängert. Einen zusätzlichen Hinweis auf die Struktur gibt die von Ledl und Severin ³⁵ aus einem Amino-Hexose-Redukton-Furfurol Reaktionsgemisch isolierte Verbindung **90**, deren Bildung durch Kondensation des Furfurols mit der Methylenreduktinsäure erklärbar ist. Ein einfacher plausibler Reaktionsmechanismus kann aber nur von **85a** ausgehend formuliert werden.

An Hand der verschiedenen Spektren läßt sich allerdings

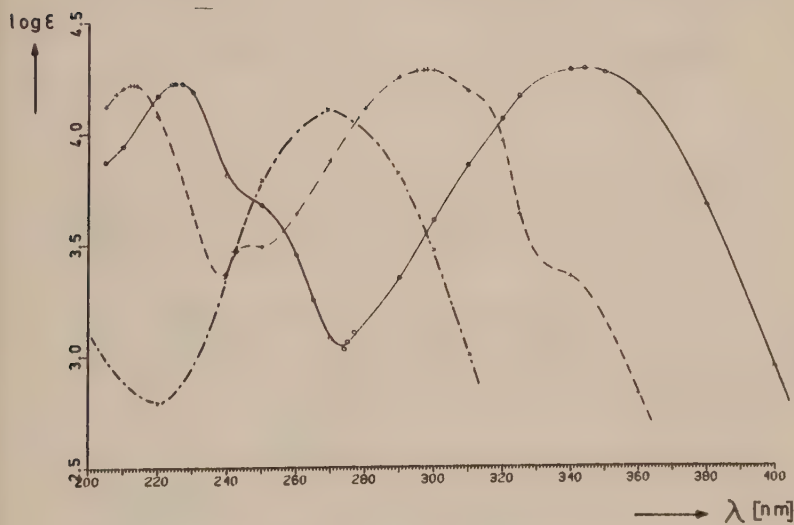
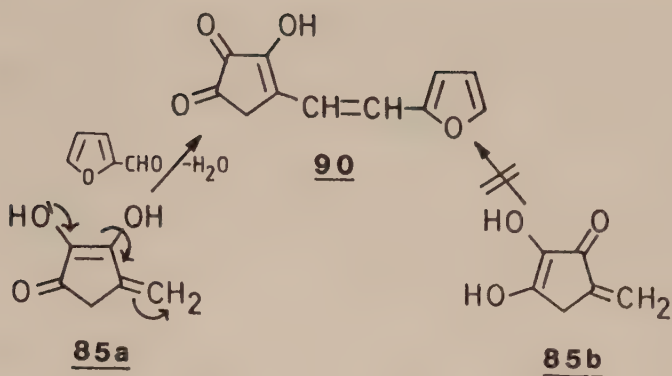


Abb. 10 : UV-Spektren von 84 (in EtOH) - · - · - ; 85 (in MeOH) - - - - und 99 (in MeOH) - - - -

nicht entscheiden, welche der tautomeren Formen vorliegt. Im UV-Spektrum sieht man die im Vergleich zur Methylreduktinsäure (84) und Reduktinsäure ($\lambda_{\max} = 268 \text{ nm}$) deutliche Verschiebung des Absorptionsmaximums zu $\lambda_{\max} = 298 \text{ nm}$ (Abb. 10).

Während 85a und 85b als tautomere Formen einer vinylogenen Carbonsäure aufzufassen sind, besteht zwischen 85a und der Diketoverbindung 86 eine Keto-Enol-Tautomerie.



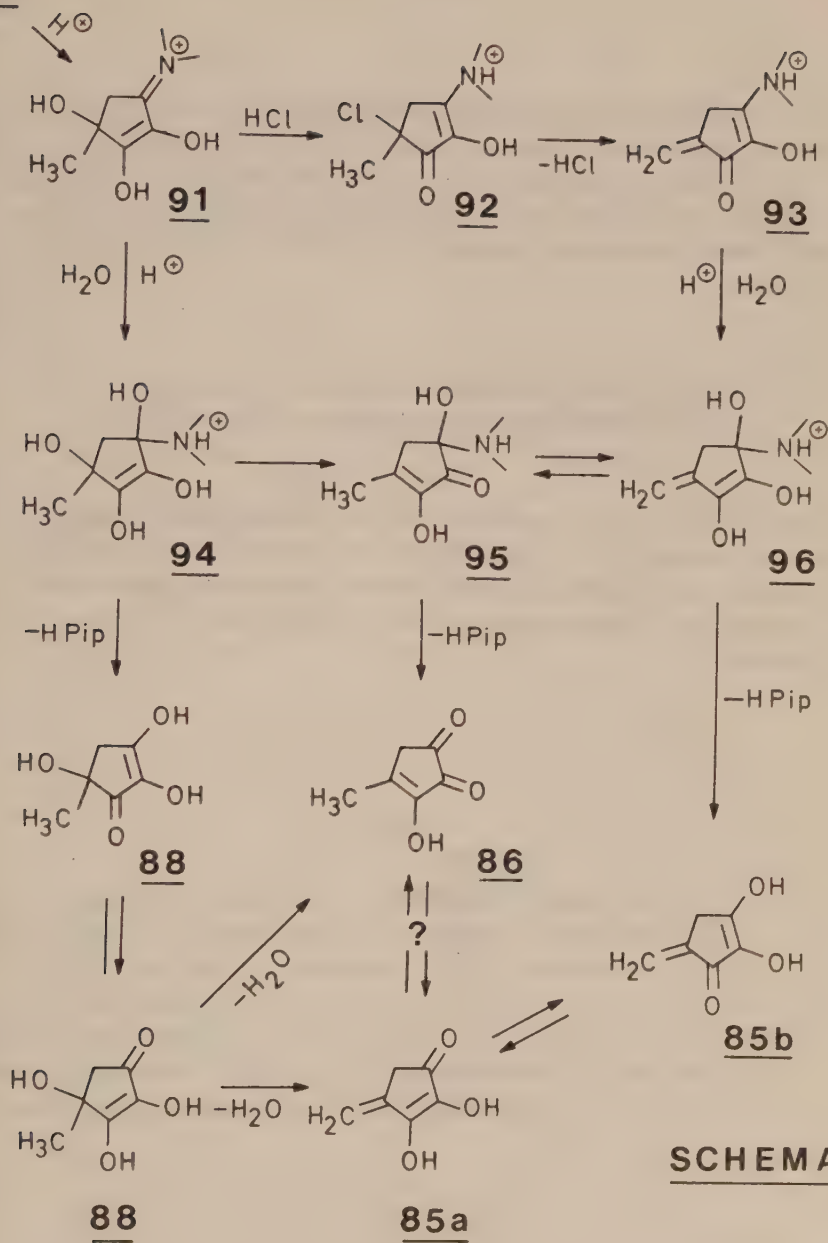
Da sowohl 85 als auch 86 bei der Hydrolyse des Piperidino-Hexose-Reduktions entstehen, könnte man vermuten, daß sich zwischen beiden isomeren Formen in saurer Lösung ein Gleichgewicht einstellt.

Einige zur Orientierung durchgeführte Versuche konnten dies allerdings nicht endgültig klären. Die Methylenreduktinsäure zeigte dünnschichtchromatographisch erst nach längerer Erwärmung in saurer wässriger Lösung Zersetzung zu verschiedenen nichtdefinierten Produkten.

86 ist zwar wie erwartet die reaktivere und instabilere Verbindung, aber auch hier konnte im Säuren ein Gleichgewicht zwischen beiden Isomeren nicht beobachtet werden.

38

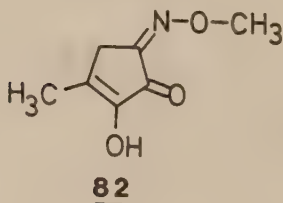
-67-

SCHEMA G

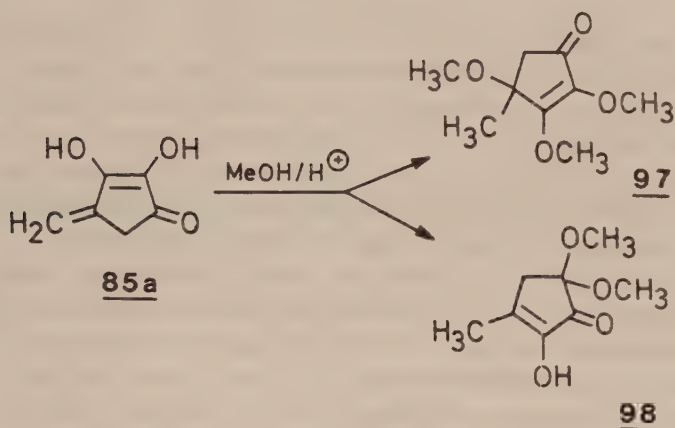
Für die Bildung der Methylenreduktinsäure (85) und der Diketoverbindung 86 aus dem Piperidino-Hexose-Redukton (38) lassen sich durch die unterschiedlichen Möglichkeiten der Isomerisierung, der Hydrolyse des Stickstoffatoms und der Wasserabspaltung verschiedene Abbauwege formulieren (Schema G).

4.3 Derivate der Methylenreduktinsäure (85) und des 3-Hydroxy-4-methyl-cyclopent-3-en-1,2-dions (86)

Während 86 mit dem Hydrochlorid des O-Methylhydroxylamins nahezu quantitativ zu dem bereits erwähnten Oximderivat 82 reagiert, verläuft die Reaktion mit der Methylenreduktinsäure unter gleichen Bedingungen in nicht so guten Ausbeuten.



Erhitzt man die Methylenreduktinsäure (85) mit methanolischer Salzsäure, erhält man als Hauptprodukt die beiden Methylether 97 und 98, die schon Pehr³⁶ bei der Methanolyse des Piperidino-Hexose-Reduktions als Nebenprodukte isolieren konnte.



Die Strukturen ließen sich an Hand von Vergleichsspektren eindeutig als 1-Methyl-1,2,3-trimethoxy-cyclopent-2-en-4-on (97) und als 1,1-Dimethoxy-3-hydroxy-4-methyl-cyclopent-3-en-2-on (98) festlegen.

Beide Methylether 97 und 98 eignen sich gut zur gaschromatographischen Detektion der Methylenreduktinsäure (85); durch Derivatisierung zum O-Methyloxim 82 läßt sich sowohl

die Methylenreduktinsäure als auch die Diketoverbindung 86 gaschromatographisch bestimmen.

4.4 Reaktionsprodukt von 38 mit primären Aminen

In wässriger oder ethanolischer Lösung war es nicht möglich, den Piperidinrest des Amino-Hexose-Reduktions durch einen primären Aminrest auszutauschen. Aus diesem Grund verwendete ich Dimethylformamid als Lösungsmittel für die weiteren Umsetzungen. Ich erwärmte 38 mit dem Hydrochlorid des Glycinethylesters. Nach Extraktion der Lösung mit Methylchlorid und anschließender fraktionierter Hochvakuumsublimation erhielt ich neben den bereits bekannten Hydrolyseprodukten 85, 86 eine kristalline gelbe Verbindung. Aus Elementaranalyse und dem Molekülpeak des Massenspektrums ergibt sich die Zusammensetzung $C_{10}H_{13}NO_4$. Wichtige Hinweise bei der Strukturaufklärung liefert das NMR-Spektrum: Neben den Signalen bei $\delta = 1,23$ ppm (t, 3H, J=7Hz) und $\delta = 4,20$ ppm (q, 2H, J=7Hz), die man der Ethoxygruppe des Aminosäureesters zuordnen muß, erhält man für die CH_2 -Gruppe der Aminosäure im NMR-Spektrum ein Signal bei $\delta = 4,23$ ppm (s, 2H). Die leicht aufgespaltenen Signale bei $\delta = 5,13$ ppm (s, 1H) und $\delta = 5,76$ ppm (s, 1H), das ebenfalls geringfügig aufgespaltene Signal bei $\delta = 3,10$ ppm weisen auf das entsprechende Strukturelement der Methylenreduktinsäure hin.

An Hand weiterer Spektraldaten (IR, MS) läßt sich die Struktur festlegen, und Verbindung 99 kann als neues, bisher

nicht bekanntes 5-Ring-Redukton mit primärem Aminrest identifiziert werden.

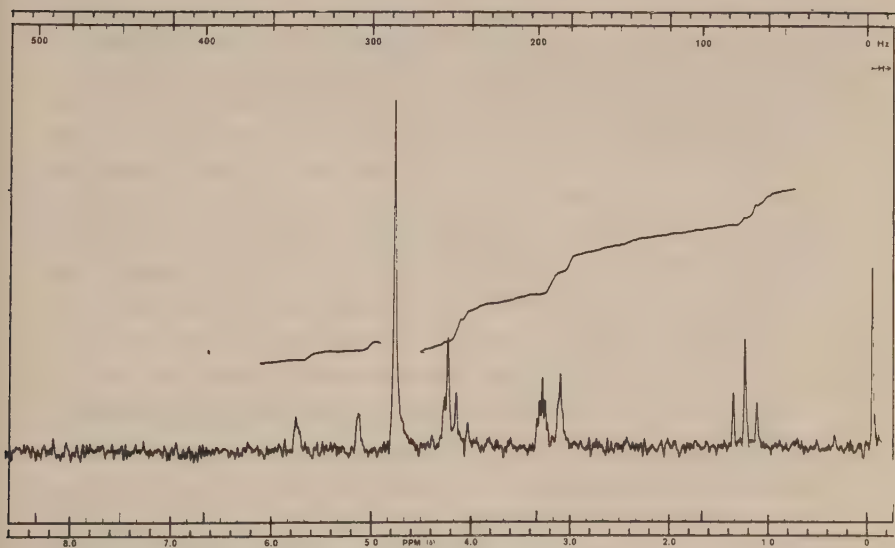
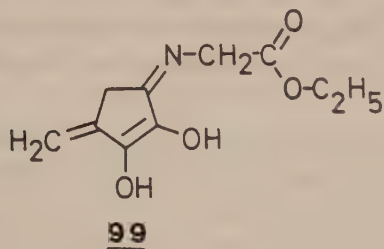


Abb. 11 : NMR-Spektrum von 99 in CD_3OD

Das UV-Spektrum von 99 weist im Vergleich zu der Methylenreduktinsäure (85) eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um 46 nm zu $\lambda_{\text{max}} = 344 \text{ nm}$ auf (Abb. 10). Für die Verwandtschaft beider Strukturen spricht der durch den Austausch der Heteroatome zwar verschobene, aber ähnliche Verlauf der UV-Kurven.

Unter gleichen Bedingungen erhielt ich sowohl aus der Methylenreduktinsäure als auch aus der Diketoverbindung 86 mit Glycinethylester das Aminoreduktion 99. Bei der Umsetzung mit Benzylamin isolierte ich die entsprechende Verbindung 100 (Einzelheiten siehe experimenteller Teil).

Ob die Methylenreduktinsäure (85) und die Diketoverbindung 86 im Verlaufe der Maillard Reaktion überhaupt entstehen, oder ob sie zu Folgeprodukten weiterreagieren, muß in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

Zusammenfassung

Zucker können unter verschiedenen Bedingungen, insbesondere bei Maillard Reaktionen in Reduktone und Aminoreduktone umgewandelt werden. Die bekanntesten sind das Trioseredukton (11), das aus Glucose im stark Alkalischen erhalten wird, sowie die Reduktinsäure (12), die sowohl aus Hexuronsäuren als auch aus Pentosen im Sauren entsteht.

Aus Monosacchariden erhält man mit sekundären Aminen sowohl das Amino-Hexose-Redukton (38) als auch C4-Aminoreduktone der Struktur 48, während man mit primären Aminen bisher nur C4-Aminoreduktone isolieren konnte.

Für 48 wurde eine Nachweismethode erarbeitet, mit deren Hilfe man diese Verbindungen unabhängig von ihrer Aminkomponente erfassen kann. Bei der Reaktion verschiedener C4-Aminoreduktone mit Methylhydrazin erhält man zwei isomere Hydroxypyrazole. Diese Reaktionsprodukte, das 1,3-Dimethyl- und das 1,5-Dimethyl-4-hydroxypyrazol (58/59) lassen sich gaschromatographisch gut bestimmen. Mit anderen monosubstituierten Hydrazinen konnten die entsprechenden N-substituierten 4-Hydroxypyrazole isoliert werden, deren gaschromatographische Bestimmung eine mögliche Variation der vorgestellten Nachweismethode erlaubt.

Mono- und Disaccharide werden mit Glycin bei verschiedenen Temperaturen umgesetzt. Durch die Reaktion mit Methylhydrazin zu den Isomeren 58/59 ist es möglich, die Menge des C4-Aminoreduktons quantitativ für die einzelnen Zucker zu bestimmen. Daß sich diese Nachweismethode auch für komplexere

Reaktionsgemische eignet, zeigt der Nachweis der C4-Amino-reduktone in Malzextrakt.

Das aus einem Bräunungsgemisch isolierte Umsetzungsprodukt von Methylhydrazin mit Diacetylformoin (71, bzw. 72) sowie die mit dem Triosereduktions (11), dem Methylreduktion (65) und den beiden cyclischen Reduktionethern 29, 33 erhaltenen 4-Hydroxypyrazole weisen darauf hin, daß die Reaktion mit Methylhydrazin eine allgemein anwendbare Derivatisierungsmöglichkeit für Reduktionen und Aminoreduktionen darstellt. Man erwartet, daß sich auf diese Weise weitere bisher unbekannte Verbindungen isolieren und identifizieren lassen.

Die Hydrolyse des Piperidino-Hexose-Reduktions (38) führt zur Isolierung zweier bisher unbekannter Zuckerabbauprodukte : der Methylenreduktinsäure (85) und der isomeren Diketoverbindung 86 . Durch geeignete Derivatisierung zu O-Methyloximen oder Methylethern wurden beide gaschromatographisch bestimmt.

Die Umsetzung des Amino-Hexose-Reduktions (38) mit primären Aminen führte zur Bildung eines neuen, in der Literatur bisher nicht beschriebenen Aminoreduktion (99).

Ob die Methylenreduktinsäure (85) oder die Diketoverbindung 86 bei der nichtenzymatischen Bräunung gebildet werden, und ob bei Maillard Reaktionen mit primären Aminen Aminoreduktionen der Struktur 99 entstehen, muß in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

EXPERIMENTELLER THEIL

Allgemeine Methoden

Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm Fa-Merck

Schichtchromatographie

Chromatographische Trennungen wurden mit Kieselgel PSC-Fertigplatten Merck F₂₅₄ (2mm Schichtdicke) ausgeführt

Säulenchromatographie

Kieselgel, Silica Woelm TSC Aktivität 111/30 mm nach Brockmann und Schrodder

IR-Spektrometer

Perkin -Elmer 257 Grating Infrared Spektrophotometer

Massenspektrometer

Varian CH 7 Mass-Spektrometer (70 eV, Ionenquellentemperatur 230°C)

¹H-NMR-Spektrometer

Varian T 60 NMR Spektrometer (60 MHz)

UV-Spektrometer

Beckmann Spektrophotometer 25

Gaschromatographie

Varian Aerograph Series 2800

GC-MS Kopplung

Varian Aerograph Series 2800 gekoppelt mit Massenspektrometer Varian MAT CH 7

Ionenquelle: 230 °C, gemessen wurde bei 70 eV

1. Bräunungsreaktionen von Glucose mit Methylamin

Eine Lösung von 270 g Glucose, 35 g Methylamin (40%), 45 g Eisessig in 800 ml Wasser wird 4h auf 80°C erwärmt. Die erkaltete Lösung extrahiert man 3h im Perforator mit Methylenchlorid. Der Methylenchloridextrakt wird über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel i.Vak. abdestilliert.

1.1 Isolierung des C4-Methylaminoreduktions (48)

Den aus 1. erhaltenen Extrakt reinigt man durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.Vak. kristallisiert der verbleibende ölige Extrakt beim Stehen im Kühlschrank nach 12h durch. Mit wenig Essigester wird vom anhaftenden Öl entfernt und man erhält 48.

48: farblose Kristalle, Smp 86°C, Ausbeute 0,13% bezogen auf Glucose

¹H-NMR (CD₃OD) δ = 2.14(s, 3H, CH₃), 3.00(s, 3H, N-CH₃), 7,0(s, 1H, olef.-H)

IR:(KBr) 3400, 3300, 1680, 1580 cm⁻¹

MS: m/e 115(100, M⁺), 72(94), 44(96), 43(81), 42(52),

C₅H₉NO₂ (115,13) Ber(%): C 52,16 H 7,88 N 12,17
Gef(%): C 52,06 H 7,56 N 12,12

1.2 Gaschromatographische Bestimmung des C4-Methylamino-reduktons (48)

Der aus 1 erhaltene Extrakt wird mit wenig Methylenchlorid aufgenommen und im GC-MS-System untersucht.

Gaschromatographie:

Säule: Stahlsäule 2,5% OV 17 80-100 mesh, Chromosorb G AW
DMCS

Säulentemperatur: 80°C - 280°C mit einer Aufheizrate von $4^{\circ}/\text{min}$

Injektortemperatur: 250°C

Detektortemperatur: 280°C

Gasdurchfluß : 30 ml/min

Retentionszeit des C4-Methylaminoreduktons : RT = 13,75 min

2. 1-Ethylether des Methylreduktons (52)

Eine Lösung von 100 mg ($0,87\text{ mmol}$) 48, 151,5 mg ($1,74\text{ mmol}$) Morpholin in 10 ml Wasser/Ethanol (4:5) wird mit 6 mg Natriumacetat und 2-3 ml Eisessig auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt und 2h am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Erkalten des Reaktionsgemisches wird mit 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Den verbleibenden Rückstand reinigt man durch Sublimation im Hochvakuum bei $70^{\circ}\text{C}/0,1\text{ Torr}$;

52: farblose Kristalle, Smp. 60°C, Ausbeute: 10%

¹H-NMR (CDCl₃) δ = 1,4 (t, J=6Hz, 3H, CH₃), 2,25 (s, 3H, CH₃),
4,1 (q, J=6Hz, 2H, CH₂), 6,75 (s, 1H, olef.-H)

IR: (KBr) 3400, 3000, 1680, 1630, 1390, 1360, 1260, 1200,
1100, 1020, 910, 830, 670 cm⁻¹

MS: m/e 130(52, M⁺) 114(22) 102(56) 87(78) 84(31) 73(24)
70(26) 59(28) 45(52) 43(100)

Mit besseren Ausbeuten kann man 52 herstellen, wenn man vom C4-Morpholinoreduktions (51) ausgeht:

Eine Lösung von 1 g (5,84 mmol) C4-Morpholinoreduktion (51) in 100 ml Ethanol wird mit conc. Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und 4h am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Rotavapor entfernt, der Rückstand im Hochvakuum sublimiert. Ausbeute: 60%

3. Umsetzung des C4-Morpholinoreduktions (51) mit Aminosäureestern

3.1 C4-Glycinesterreduktion (54)

2 g (11,68 mmol) C4-Morpholinoreduktion (51)²³ werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und bei 100°C (Ölbadtemperatur) erwärmt. Man läßt 1,63 g (11,68 mmol) Glycinester-Hydrochlorid in 30 ml DMF zutropfen und erwärmt dieses Reaktionsgemisch so lange, bis dünnschichtchromatographisch

keine Ausgangsverbindung mehr nachweisbar ist (ca. 2h). Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird das Lösungsmittel im Vapsilator entfernt, der Rückstand mit 30 ml Wasser aufgenommen und 4 mal mit 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden gesammelt, das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand im Hochvakuum bei 145°C/0.1 Torr sublimiert.

54: hellgelbe Kristalle, Smp. 108°C, Ausbeute: 53%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 1,4(t, J=7Hz, 3H, CH_3), 2,25(s, 3H, CH_3),
4,05(s, 2H, CH_2 , D_2O -Austausch), 4,3(q, J=7Hz, 2H,
 CH_2), 6,6(s, 1H, olef.-H, D_2O -Austausch)

IR: (KBr) 3350, 3000, 1760, 1670, 1590, 1200, 1030, 980,
880 cm^{-1}

MS: m/e 187(36, M^+) 116(20) 114(100) 96(17) 86(17) 72(32)
70(53) 43(87) 42(59)

$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (187,195) Ber(%): C 51,33 H 7,00 N 7,48
Gef(%): C 51,52 H 6,93 N 7,03

3.2 Herstellung von 56 aus 51 und Alaninmethylester

Veresterung der Aminosäure: 2,5 mmol der Aminosäure werden mit 50 ml 3N HCl in Methanol 1h am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Danach wird das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Man nimmt den Rückstand mit 7 ml Dimethylformamid auf, erwärmt die Lösung auf 100°C (Ölbadtemperatur) und läßt 2,5 mmol

(427,3 mg) C4-Morpholinoreduktion in 30 ml DMF im Verlauf von 15 min langsam zutropfen. Das Lösungsmittel wird im Vapsilator entfernt. Den Rückstand nimmt man mit wenig Essigester auf und chromatographiert über eine Kieselgelsäule mit Essigester : Petrolether (1:1) als Elutionsmittel. Nach Entfernen des Lösungsmittelgemisches i.Vak. destilliert man den Rückstand im Hochvakuum bei 125°C/0,1 Torr

56: farbloses Öl, Ausbeute 11%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 1,52(d, J=7Hz, 3H, CH_3), 2,20(s, 3H, CH_3),
3,83(s, 3H, O-CH_3), 6,6(s, 1H, olef.-H, D_2O -Austausch)
tausch)

IR: (Film) 3400, 1740, 1670, 1580, 1260, 1160, 1090 cm^{-1}

MS: m/e 187(77, M^+) 128(100) 110(20) 86(64) 84(38) 57(57)
56(57) 43(72)

3.3 Herstellung von 55 aus 51 und Phenylalaninmethylester

Die Veresterung der Aminosäure und die Umsetzung mit 51 erfolgt nach Vorschrift 3.2. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhält man ein farbloses Öl, das sich an der Luft schnell zersetzt.

55: farbloses Öl, Ausbeute: 5%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 2,07(s, 3H, CH_3), 3,8(s, 3H, O-CH_3), 6,3(s,
1H, olef.-H, D_2O -Austausch), 7,3(s, 5H, arom.-H)

MS: m/e 263(50, M^+) 262(42) 204(48) 172(14) 112(67) 91(62)
77(22) 65(23) 43(100)

4. Allgemeine Vorschrift zur Umsetzung von offenkettigen Reduktonen mit Hydrazin

Eine Lösung von 1 mmol des entsprechenden Reduktons in 10 ml Wasser wird bei 80°C (Ölbadtemperatur) gerührt. Man gibt 1 mmol des Hydrazins hinzu und stellt die Lösung - falls erforderlich - mit conc. Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 ein. Wenn dünnschichtchromatographisch kein Redukton mehr nachgewiesen werden kann (in der Regel nach ca. 30 min) wird die wässrige Lösung mit NaOH neutralisiert (pH=7) und nach Erkalten mit Methylenchlorid extrahiert. Die Methylenchloridphase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Rotavapor entfernt und der Rückstand im Hochvakuum fraktioniert destilliert.

4.1 1,3-Dimethyl- und 1,5-Dimethyl-4-hydroxypyrazol (58/59)

Aus 115 mg (1 mmol) C4-Methylaminoredukton(48) bzw. aus 171 mg (1 mmol) C4-Morpholinoredukton (51) nach der allgemeinen Vorschrift 4.

Ausbeute aus 48 bzw. 51 ca. 85%

Nach Sublimation im Hochvakuum erhält man bei 85°C/0.1 Torr

58: farblose Kristalle, Smp. 80°C , dünnschichtchromatographischer Nachweis : Rf 0.32 (Fließmittelgemisch Essigester : Toluol 1:1); gaschromatographischer Nachweis : RT 11,25 min (GC-Bedingungen siehe 1.2)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2,10(s, 3H, C- CH_3), 3,65(s, 3H, N- CH_3),
7,0(s, 1H, aromaten-H)

IR : (KBr) 3050, 1580, 1430, 1400, 1320, 1175, 1140,
1005, 735 cm^{-1}

MS : m/e 112(100, M^+) 42(98)

$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ (112,132) Ber(%) : C 53,56 H 7,19 N 24,98
Gef(%) : C 53,25 H 6,94 N 25,07

Bei der fraktionierten Hochvakuumsublimation erhält man bei einer Temperatur von $130^{\circ}\text{C}/0,1$ Torr die isomere Verbindung 59

59: farblose Kristalle, Smp. 121°C , DC-Bestimmung : Rf 0.32
GC-Bestimmung : RT 13,75 min (Bedingungen siehe 1.2)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2,16(s, 3H, C- CH_3), 3,66(s, 3H, N- CH_3)
6,96(s, 1H, aromaten-H)

IR : (KBr) 3100-2900, 1600, 1515, 1430, 1390, 1350, 1330,
1290, 1115, 1010 cm^{-1}

MS : m/e 112(100, M^+) 56(78) 42(88)

$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ (112,132) Ber(%) : C 53,56 H 7,19 N 24,98
Gef(%) : C 53,60 H 7,07 N 24,93

4.2 4-Hydroxy-3-methyl-1-phenyl-pyrazol und 4-Hydroxy-5-methyl-1-phenyl-pyrazol (66/66a)

Aus 342 mg (2 mmol) 51 nach der allgemeinen Vorschrift 4. Abweichend davon wird die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach Sublimation im Hochvakuum bei 130°C bzw. 150°C erhält man jeweils farblose Kristalle. Eine vollständige Trennung war aber nicht möglich, so daß kein definierter Schmelzpunkt angegeben werden kann; Ausbeute: 48%

66: dünnschichtchromatographische Bestimmung: Rf 0.88
Fließmittelgemisch Essigester:Toluol 1:1); GC-Bestimmung : RT 21,5 min (GC-Bedingungen siehe 1.2)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2,3(s,3H, CH_3), 7,4(s,1H,aromaten-H),
7,56(m,5H,aromaten-H)

IR: (KBr) 3100-2950, 1600, 1590, 1400, 1180, 940, 760,
730, 690 cm^{-1}

MS: m/e 174(100, M^+) 104(74) 78(36) 77(79) 51(40) 42(13)

66a: DC-Bestimmung : Rf 0.80 (Essigester:Toluol 1:1),
GC-Bestimmung : RT 24,8 min (GC-Bedingungen siehe 1.2)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2,23(s,3H, CH_3), 7,27(s,1H,aromaten-H),
7,43(m,5H,aromaten-H)

IR: (KBr) 3050, 2980, 1600, 1495, 1400, 1370, 1280,
1200, 1110, 700 cm^{-1}

MS: m/e 174(100, M^+) 118(21) 105(31) 79(20) 77(54) 51(30)
42(58)

4.3 1-Benzyl-4-hydroxy-3-methyl- und 1-Benzyl-4-hydroxy-5-methyl-pyrazol (67/67a)

Aus 342 mg (2 mmol) 51 nach der allgemeinen Vorschrift 4. Abweichend davon wird die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Das im Verlaufe der Reaktion ausfallende Reaktionsprodukt wird abfiltriert und durch Sublimation im Hochvakuum bei 140^o- 150^oC/0.1 Torr erhält man ein Gemisch beider Isomerer 67/67a.

67 und 67a: hellgelbe Kristalle, Ausbeute 75%, DC-Bestimmung : Rf-Wert 0.76 bzw. 0,72 (Fließmittelgemisch Essigester:Toluol 1:1), GC-Bestimmung : RT 23,1 min bzw. 23,7 min (GC-Bedingungen siehe 1.2)

¹H-NMR (CD₃OD) δ = 2,07(s,3H,CH₃), 2,13(s,3H,CH₃), 5,07(s, 2H,CH₂), 5,20(s,2H,CH₂), 7,20(m,12H,aromaten-H)

IR:(KBr) 1600, 1460, 1440, 1360, 1200, 1150, 1020, 775, 720, 680 cm⁻¹

MS: m/e 188(59,M⁺) 173(9) 91(100) 65(22) 42(12) 39(10)

4.4 4-Hydroxy-3-methyl-1-propyl- und 4-Hydroxy-5-methyl-1-propyl-pyrazol (68/68a)

Aus 171 mg (1 mmol) 51 nach der allgemeinen Vorschrift 4.

Man destilliert das Isomerengemisch im Hochvakuum bei $100^{\circ}\text{C}/0.1$ Torr

68/68a: farbloses Öl, Gemisch der beiden Isomeren, DC-Bestimmung R_f 0.65 (Fließmittel Essigester:Toluol 1:1), GC-Bestimmung RT 16,0 bzw. 17,75 min (GC-Bedingungen siehe 1.2)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 0,9 (t, $J=7\text{Hz}$, 6H, CH_3), 1,77 (m, 4H, CH_2), 2,13 (s, 3H, CH_3), 2,2 (s, 3H, CH_3), 3,9 (m, 2H, N-CH_2), 3,97 (m, 2H, N-CH_2), 7,07 (s, 1H, aromaten-H), 7,1 (s, 1H, aromaten-H)

IR: (Film) 2975, 1660, 1580, 1430, 1350, 1280, 1110, 1000 cm^{-1}

MS: m/e 140(80, M^+) 111(100) 98(76) 70(15) 57(17) 43(52) 42(47)

4.5 Reaktion von 58/59 mit HCl

Synthese von 58/59 wie unter 4.1 beschrieben. Das Isomerengemisch wird in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und nach Zugabe von 3 Tr. conc. Salzsäure 1h bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Das Lösungsmittel wird fast vollständig im Rotavapor entfernt, der Rückstand im Hochvakuum bei $110^{\circ}\text{C}/0.1$ Torr sublimiert.

69/69a: farblose Kristalle, HCl-Salze der Isomeren, Ausbeute 90%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2,31 (s, 3H, CH_3), 2,35 (s, 3H, CH_3), 3,96
(s, 6H, N-CH_3), 7,63 (s, 2H, aromaten-H)

IR: (KBr) 3200-2900, 1620, 1600, 1575, 1500, 1425, 1355,
1300, 1140, 1020, 820 cm^{-1}

MS: m/e 112(100, M^+) 56(85) 42(78)

5. Ausarbeitung einer Nachweismethode

5.1 Überprüfung der Derivatisierungsmöglichkeit mit Methylhydrazin und Wiederfindungsversuch

15,6 mg (0,091 mmol) C4-Morpholinoreduktion (51) werden in einem Kilogramm Wasser gelöst. Man gibt 5 g Methylhydrazin zu, stellt mit conc. Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 ein und erwärmt 20 min bei 80°C . Nach Neutralisation (NaOH , $\text{pH}=7$) extrahiert man 4h mit Methylenchlorid im Perforator. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösungsmittels im Rotavapor werden 5 mg C4-Morpholinoreduktion (51) als innerer Standard zugewogen, der Rückstand mit wenig Methanol aufgenommen und das Gemisch im Gaschromatographen untersucht.

Gaschromatographische Bedingungen siehe 1.2; Ergebnisse im theoretischen Teil.

5.2 Bestimmung des Verlustes von 58/59 beim Ausschütteln im Säuren und Basischen

93,5 mg (83,5 mmol) der Pyrazolisomeren 58/59 werden in 100 ml Wasser gelöst, mit conc. Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und jeweils 2mal mit 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die vereinigten Methylenchlorid-extrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der verbleibende Rückstand mit wenig Methanol aufgenommen. Mit innerem Standard (C4-Morpholino-reduktion) wird gaschromatographisch eine quantitative Bestimmung von 58/59 durchgeführt. Auf diese Weise läßt sich eine Menge von 0.0406 mg 58/59 gaschromatographisch nachweisen (GC-Bedingungen siehe 1.2).

Die verbleibende Lösung macht man mit Natronlauge alkalisch (pH= 10) und schüttelt 2mal mit 50 ml Methylenchlorid aus. Die Methylenchloridphasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Rotavapor entfernt. Der Rückstand wird mit wenig Methanol aufgenommen und mit innerem Standard gaschromatographisch bestimmt. Hierbei können keine Hydroxypyrazole nachgewiesen werden.

Anschließend wird die wässrige Lösung mit HCl neutralisiert (pH-Wert = 7) und im Perforator mit Methylenchlorid 3h extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, und der verbleibende Rückstand in wenig Methanol gelöst. Mit innerem Standard können die Hydroxypyrazole 58/59 gaschromatographisch bestimmt werden (88,9 mg). Gaschromatographische Bedingungen siehe 1.2

5.3 Glucose-Glycin-Blindversuch

10 Ansätze mit jeweils 1 Mol (180 g) Glucose, 1 Mol (75 g) Glycin in 600 ml Wasser (Zucker und Aminosäure werden bei Raumtemperatur gelöst) erwärmt man bei 80°C, gibt 5 g Methylhydrazin (98%) hinzu und säuert mit conc. Salzsäure an (pH-Wert=3). Nach 20 Minuten Reaktionsdauer wird mit Natronlauge neutralisiert (pH=7) und anschließend 3h mit Methylenchlorid im Perforator extrahiert. Der Methylenchlorid-extrakt wird mit 30 ml Wasser aufgenommen und anschließend im Säuren und Basischen wie unter 5.2 beschrieben weiter gereinigt. Danach wird die wässrige Phase neutralisiert und erneut mit Methylenchlorid im Perforator 3h extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i.Vak. abdestilliert, der ölige Rückstand in wenig Methanol gelöst und die beiden Hydroxypyrazole 58/59 gaschromatographisch (mit innerem Standard) quantitativ bestimmt. Gaschromatographische Bedingungen siehe 1.2 ; Ergebnisse siehe theoretischer Teil

5.4 Vergleich der direkten gaschromatographischen Bestimmung der C4-Aminoreduktone mit der gravimetrischen, bzw. der indirekten GC-Bestimmung über die Hydroxypyrazole 58/59

5.4.1 Gravimetrische Bestimmung

Das nach 1.1 erhaltene Öl kristallisiert im Kühlschrank nach

12h durch. Die anhaftenden Verunreinigungen können durch Lösen in wenig Essigester entfernt werden. Nach Trocknen der Kristalle im Hochvakuum werden diese ausgewogen. Ergebnisse siehe theoretischer Teil.

5.4.2 Direkte GC-Bestimmung von 48

Die gaschromatographische Bestimmung wird wie unter 1.1 und 1.2 beschrieben durchgeführt. Ergebnisse siehe theoretischer Teil.

5.4.3 GC-Bestimmung von 48 über die Hydroxypyrazole 58/59

Zu dem nach 1 erhaltenen Reaktionsgemisch gibt man 5 g Methylhydrazin, stellt mit conc. Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 ein und erwärmt 15 min auf 80°C (Wasserbadtemperatur). Nach Neutralisation des Reaktionsgemisches wird 4 h mit Methylenchlorid im Perforator extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand mit 30 ml Wasser aufgenommen, im Sauren und Basischen ausgeschüttelt, die wässrige Phase neutralisiert und erneut 3h mit Methylenchlorid im Perforator extrahiert. Es folgt eine quantitative GC-Bestimmung des erhaltenen Extraktes mit einer definierten Menge C4-Morpholinoreduktion als innerer Standard . GC-Bedingungen siehe 1.2 ; Ergebnisse siehe Tabelle 2 theoretischer Teil.

6. Allgemeine Vorschrift zum Nachweis von C4-Aminoredukto- nen in Zucker-Amin-Bräunungsgemischen

6.1 Bräunungsreaktionen von Zuckern mit Glycin

Eine Lösung von 1 Mol Zucker, 1 Mol (75 g) Glycin in 800 ml Wasser wird 4h bei verschiedenen Temperaturen erwärmt. Die erhaltene wässrige Lösung wird 12h im Perforator mit Methylenchlorid extrahiert. Zur extrahierten wässrigen Lösung gibt man 5 g Methylhydrazin, stellt mit conc. Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 ein und erwärmt 15 min auf 80°C (Wasserbadtemperatur). Das Reaktionsgemisch wird mit NaOH neutralisiert (pH=7) und 3h im Perforator mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. nimmt man den öligen Rückstand mit ca. 30 ml Wasser auf. Man alkalisiert mit 2N NaOH (pH=10), schüttelt 3mal mit insgesamt 100 ml Methylenchlorid aus. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit HCl (pH=3) wird erneut mit 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt , die organischen Phasen verworfen und die wässrige Phase mit NaOH neutralisiert und im Perforator 3h mit Methylenchlorid extrahiert. Der Methylenchloridextrakt wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. eingedampft. Den Rückstand löst man in wenig Methanol. Mit innerem Standard (siehe 5.1) wird im GC-MS-System eine quantitative Bestimmung durchgeführt. GC-Bedingungen siehe 1.2. Die für Fructose, Glucose, Maltose, Lactose und Saccharose erhaltenen Werte sind in Tabelle 3 (theoretischer Teil) zusammengefaßt.

6.2 Nachweis der C4-Aminoreduktone in Malzextrakt

500 g Maltzin hell (Fa-Diamalt, Art.Nr.150) und 1,25 kg Maltzin "trocken"Pt (Fa-Diamalt) werden in Wasser gelöst. Jeweils 600 ml wässrige Lösung werden mit Methylenchlorid im Perforator extrahiert. Zur wässrigen Lösung gibt man 4 g Methylhydrazin, säuert mit Salzsäure an und arbeitet wie in der allgemeinen Vorschrift 6.1 beschrieben weiter auf. Ergebnisse siehe theoretischer Teil.

7. Umsetzung von Bräunungsprodukten mit Methylhydrazin

7.1 Herstellung von 71a, 71b bzw. 72 aus Diacetylformoin(30)

Das Diacetylformoin(30) wird nach einer Vorschrift von Goto et al. ³⁷ hergestellt. 100 mg (0,7 mmol) werden in 5 ml Ethanol gelöst, ca. 100 mg (2,2 mmol) Methylhydrazin hinzugegeben und mit conc. Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Nachdem die Lösung kurz (5 min) am Rückfluß erwärmt wird, läßt man abkühlen, entfernt das Lösungsmittel weitgehend im Vakuum und filtriert die kristallin anfallende Substanz 71a,b bzw. 72 ab.

¹H-NMR (CD₃OD) δ = 2,3(s, 3H, CH₃), 2,47(s, 3H, CH₃), 3,97(s, 3H, N-CH₃)

IR: (KBr) 3100, 1595, 1570-1560, 1495, 1390, 1355,
1300, 1230, 1105, 965, 790 cm^{-1}

MS: m/e 154(59, M^+) 125(18) 97(11) 56(95) 42(100)

7.2 Isolierung von 71a,b bzw. 72 aus einem Glucose-Methylamin-Bräunungsgemisch

Eine Lösung von 270 g Glucose, 35 g Methylamin(40%), 45 g Eisessig in 800 ml Wasser wird 4h bei 80°C erwärmt. Zu dieser Lösung gibt man 10 g Methylhydrazin, stellt mit conc. Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 ein und erwärmt 15 min auf 80°C (Wasserbadtemperatur). Nach Neutralisation mit Natronlauge (pH=7) wird 3h mit Methylenchlorid im Perforator extrahiert. Der Methylenchloridextrakt wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. eingedampft. Den verbleibenden öligen Rückstand destilliert man im Hochvakuum. Bei 125°C-130°C/0.1 Torr sublimieren farblose Kristalle,

71a,b bzw 72: Schmelzpunkt und Spektraldaten sind identisch mit der in 7.1 hergestellten Verbindung;
Ausbeute: 30 mg

7.3 Umsetzung des Triosereduktons (11) mit Methylhydrazin

Das Trioseredukton (11) wird nach einer Vorschrift von Euler ² aus Glucose synthetisiert. 98 mg (1 mmol) 11

werden nach der allgemeinen Vorschrift 4 umgesetzt. Im Hochvakuum sublimieren bei 70⁰/0.1 Torr farblose Kristalle.

73: Ausbeute: 76%, Smp. 68⁰C

¹H-NMR (CD₃OD) δ = 3,73(s,3H,N-CH₃), 7,04(s,1H,aromaten-H)
7,10(s,1H,aromaten-H)

IR (KBr) 3150- 2950, 1580, 1450, 1410, 1340, 1310, 1025,
1000, 850, 820, 650, 610 cm⁻¹

MS m/e 98(100,M⁺) 43(49) 42(71)

7.4 Umsetzung des Methylreduktions (65) mit Methylhydrazin

Das Methylreduktion (65) wird analog einer Vorschrift von Simon und Heubach ²³ aus C4-Morpholinoreduktion (51) synthetisiert. 102 mg (1 mmol) 65 werden nach der allgemeinen Vorschrift 4 umgesetzt. Die nach Sublimation bei 130⁰C/0.1 Torr erhaltenen Kristalle 58/59 werden durch Spektrenvergleich identifiziert. Ausbeute: 55%

7.5 Umsetzung des 1-Ethylethers des Methylreduktions (52) mit Methylhydrazin

Der nach 2 synthetisierte Ethylether des Methylreduktions (52) wird nach der allgemeinen Vorschrift 4 mit Methylhydrazin umgesetzt. Die nach Sublimation im Hochvakuum bei 130⁰C/0.1

Torr erhaltenen Kristalle 58/59 werden durch Spektrenvergleich identifiziert.

Ausbeute: 60%

7.6 Umsetzung des 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranon (29) mit Methylhydrazin

Die Herstellung von 29 erfolgt nach einer Vorschrift von Ouweland und Peer ³⁸. 100 mg (0.69 mmol) 29 werden in 5 ml Ethanol gelöst, mit 1ml Methylhydrazin versetzt und 5 min unter Rückfluß erwärmt. Nach Neutralisation der Lösung mit HCl (pH=7) wird das Lösungsmittel weitgehend entfernt, der verbleibende Rückstand in Essigester aufgenommen und von unlöslichen Bestandteilen abfiltriert. Das Filtrat chromatographiert man über eine Kieselgelsäule mit Essigester als Elutionsmittel. Hierbei wird von weiteren Verunreinigungen und Nebenprodukten abgetrennt. Mit dem Fließmittelgemisch Essigester/Methanol (95+5) läßt sich dann Verbindung 74 vom Kieselgel eluieren und man erhält nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. das Hydroxypyrazol 74 in Form farbloser Kristalle.

74: Smp. 142 °C, Ausbeute: 15%

¹H-NMR (CD₃OD) δ = 2,01(s, 3H), 3,76(s, 3H, N-CH₃), 3,92(d, 2H, J=5Hz), 4,97(t, 1H, J=5Hz)

IR: (KBr) 1595, 1505, 1300, 1280, 1070, 1050, 1020
930, 875 cm⁻¹

MS: m/e 172(29, M⁺) 154(21) 141(50) 125(38) 72(100) 42(36)

7.7 Umsetzung des 4-Hydroxy-5-methyl-2,3-dihydrofuran-3-on
(33) mit Methylhydrazin

Die Herstellung von 33 erfolgt nach einer Vorschrift von Peer und Ouweland ³⁹. 100 mg (0.88 mmol) 33 werden entsprechend der unter 7.6 angegebenen Vorschrift umgesetzt und das Reaktionsgemisch entsprechend 7.6 aufgearbeitet.

75: farblose Kristalle, Smp. 131°C, Ausbeute:15%

¹H-NMR (CD₃OD) δ = 2,1(s, 3H, CH₃), 3,72(s, 3H, n-CH₃), 4,55(s, 2H, O-CH₂)

IR: (KBr) 3175-3050, 1580, 1480, 1340, 1320, 1235, 1135, 980, 770 cm⁻¹

MS: m/e 142(88, M⁺) 125(65) 124(100) 98(25) 56(79) 55(91)
43(81) 42(82)

7.8 Umsetzung des Piperidino-Hexose-Reduktions (38) mit
Methylhydrazin

211 mg (1 mmol) Piperidino-Hexose-Reduktion (38) ²¹ werden nach der allgemeinen Vorschrift 4 mit Methylhydrazin umgesetzt. Bei der Sublimation im Hochvakuum bei 110°C/0.1

Torr erhält man farblose Kristalle.

79: Smp. 146°C , Ausbeute: 30%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 2,04(s verbr., 3H, CH_3), 2,93(s verbr., 2H, CH_2), 3,2(s, 3H, N- CH_3 , D_2O -Austausch), 10,37(s verbr., 1H, NH)

IR: (KBr) 3450-3250, 2925, 1670, 1640, 1560, 1400, 1290, 1190, 1080 cm^{-1}

MS: m/e 155(85) 154(100, M^+) 139(29) 126(27) 125(29) 112(85) 111(99) 84(74) 83(99) 69(97) 55(90) 53(58) 43(87) 41(96)

Erwärmt man 211 mg (1 mmol) 38 und 166 mg (0,5 mmol) Benzylhydraziniumoxalat in 15 ml Wasser und läßt man diese Suspension 12h bei Raumtemperatur rühren, erhält man Verbindung 80 als kristallinen Niederschlag.

80: gelbe Kristalle, Ausbeute 60%, Smp. 129°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 2,07(s verbr., 3H, CH_3), 3,0(s verbr., 2H, CH_2), 4,66(s, 2H, N- CH_2 , D_2O -Austausch), 7,33(s, 5H, aromaten-H), 10,83(s verbr., 1H, NH)

IR: (KBr) 3250, 1640, 1630, 1540, 1400, 1350 1300, 1170 1080, 900 cm^{-1}

MS: m/e 230(23, M^+) 149(9) 139(100) 111(30) 91(59) 83(43) 69(16) 65(20) 43(14) 41(25)

8. Derivatisierung der Hydroxypyrazole

8.1 Methylierung von 58/59

112 mg (1 mmol) der Hydroxypyrazole 58/59 werden in 2 ml 10% NaOH gelöst. Nach Zugabe von 160 mg Dimethylsulfat (1,27 mmol) wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Falls noch Ausgangsprodukt vorhanden ist (DC-Kontrolle) setzt man die gleiche Menge DMS zu und rührt so lange, bis 58/59 dünnschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar sind. Durch kurzes Erhitzen auf 80°C zerstört man das überschüssige DMS. Anschließend wird im Alkalischen 2,5h mit Methylenchlorid im Perforator extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand im Hochvakuum bei 110°C/0.1 Torr destilliert, man erhält ein farbloses Öl

76 a,b: GC-Bestimmung siehe 1.2, Retentionszeiten 5,9 min und 7,0 min

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2,08(s,3H, CH_3), 2,15(s,3H, CH_3), 3,7(s, 12H,2N- CH_3 ,2O- CH_3), 7,17(s,2H,aromaten-H)

IR: (Film) 3200-3100, 2950, 1750, 1580, 1450, 1330, 1190, 1020 cm^{-1}

MS: m/e 126(87, M^+) 111(58) 56(78) 42(100)

8.2 Methylierung von 75

25 mg (0.18 mmol) 75 werden in 5 ml 10% NaOH gelöst und mit 30 mg DMS über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Lösung wird im Alkalischen 3h im Perforator mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Rotavapor wird der Rückstand im Hochvakuum fraktioniert destilliert.

77: bei einer Temperatur von 95°C/0,1 Torr erhält man ein farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2,16(s,3H), 3,36(s,6H), 3,74(s,3H)
4,43(s,2H)

MS: m/e 170(55, M^+) 152(77) 123(48) 110(75) 84(83) 55(77)
43(100)

78: bei 120°C/0.1 Torr erhält man ein farbloses, nicht sehr stabiles Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2.08(s,3H, CH_3), 3,68(s,3H, N-CH_3), 3,71
(s,3H, O-CH_3) 4,49(s,2H, O-CH_2)

IR: (Film) 1570, 1480, 1380, 1310, 1240, 1140, 1030, 1010,
990, 840, 760 cm^{-1}

MS: m/e 156(98, M^+) 141(87) 139(89) 72(91) 56(41) 42(100)

9. Allgemeine Vorschrift zur Umsetzung von 38 mit
O-substituierten Hydroxylaminen

211 mg (1 mmol) Piperidino-Hexose-Redukton (38) und 1 mmol des entsprechenden O-Hydroxylamin-Salzes werden in 10 ml Wasser oder Methanol gelöst und unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Ist dünnschichtchromatographisch keine Ausgangsverbindung mehr nachweisbar, schüttelt man die wässrige Lösung 2mal mit 50 ml Ether aus. Nach Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. kann der Rückstand durch Sublimation gereinigt werden.

9.1 Umsetzung von 38 mit Hydroxylamin-Hydrochlorid

Aus 211 mg (1 mmol) 38 und 70 mg (1 mmol) Hydroxylamin-Hydrochlorid erhält man nach der allgemeinen Vorschrift 9 farblose Kristalle

81: Smp. 172°C (Zers.) Ausbeute: 68%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) $\delta = 2,02$ (s verbr., $3\text{H}, \text{CH}_3$), $3,1$ (s verbr., $2\text{H}, \text{CH}_2$)

IR (KBr) 3225, 1690, 1670, 1620, 1400, 1200, 1100, 1020
940, 770 cm^{-1}

MS: m/e 141(79, M^+) 95(25) 69(88) 43(100) 41(94)

9.2 Umsetzung von 38 mit O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid

Aus 211 mg (1 mmol) 38 und 160 mg (2 mmol) O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid erhält man nach der allgemeinen Vorschrift 9 hellgelbe Kristalle.

82: Smp. 157°C (Zers.), Ausbeute 78%, GC-Bestimmung siehe 1.2
RT 12 min

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 2,23 (s verbr., 3H, CH_3), 3,26 (s verbr., 2H CH_2), 4,23 (s, 3H, O- CH_3)

IR: (KBr) 3125, 1695, 1665, 1610, 1420, 1400, 1310, 1200, 1100, 1020, 880 cm^{-1}

MS: m/e 155(84, M^+) 95(70) 69(32) 68(48) 67(46) 41(100)
39(80)

UV (in Chloroform) λ_{max} = 312 nm, $\log \epsilon$ = 3,89

$\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_3$ (155,153) Ber(%): C 54,19 H 5,85 N 9,03
Gef(%): C 54,15 H 5,79 N 8,93

9.3 Umsetzung von 38 mit O-Benzylhydroxylamin-Hydrochlorid

Aus 211 mg (1 mmol) 38 mit 160 mg (1 mmol) O-Benzylhydroxylamin-Hydrochlorid nach der allgemeinen Vorschrift 9 erhält man hellgelbe Kristalle.

83: Smp. 130°C, Ausbeute 53%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 2,02 (s verbr., 3H, CH_3), 3,1 (s verbr., 2H, CH_2), 5,32 (s, 2H, O- CH_2), 7,35 (s, 5H, arom.-H)

IR : (KBr) 3350, 1700, 1670, 1620, 1420, 1360, 1320,
1220, 1100, 980, 880, 710 cm^{-1}

MS: m/e 231(23, M^+) 214(36) 201(16) 149(12) 132(12) 92(41)
91(100) 77(40) 69(22) 65(29) 51(24) 43(26) 41(38)

10. Isolierung der Hydrolyseprodukte 85, 86 und 88 aus 38

10 mmol (1,71 g) des Piperidino-Hexose-Reduktions (38) werden in 30 ml Wasser suspendiert und mit 1 ml conc. Salzsäure 3 min unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Erkalten der Lösung wird mit 50 ml Ether ausgeschüttelt, das Lösungsmittel über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. entfernt. Der zurückbleibende kristalline Rückstand wird mit wenig Essigester vom anhaftenden Öl befreit.

85: hellgelbe Kristalle, Smp. 138°C , Ausbeute 30%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 2,88(s verbr., 2H, CH_2), 5,0(s verbr.,
1H, olefin-H), 5,43(s verbr., 1H, olefin-H)

IR : (KBr) 3250, 1670, 1610, 1560, 1470, 1360, 1310,
1170, 1120, 980, 890 cm^{-1}

MS: m/e 126(100, M^+) 69(47) 55(28) 52(39) 43(52) 42(26)
41(31) 39(39)

UV (in Methanol) $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$, $\log \epsilon = 4,28$

$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ (126,111) Ber(%): C 57,15 H 4,80
Gef(%): C 57,00 H 4,70

Das in Essigester gelöste Öl fraktioniert man mit Essigester über eine Kieselgelsäule und eluiert die schnell laufende gelbe Zone mit den Substanzen 85 und 86. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.Vak. wird der Rückstand bei 70°C/0.1 Torr im Hochvakuum sublimiert.

86: gelbe Kristalle, Smp. 105°C, Ausbeute 5%

¹H-NMR (CDCl₃) δ = 2,3 (t, J=0,5 Hz, 3H, CH₃), 3,05 (q, J=0,5 Hz, 2H, CH₂)

IR: (KBr) 1780, 1710, 1645, 1215 cm⁻¹

MS: m/e 126(100, M⁺) 98(69) 70(76) 69(67) 55(79) 43(52)
42(40) 41(53) 39(51)

UV(in Chloroform) $\lambda_{\max}$ = 327 nm, log ϵ = 3,72

C₆H₆O₃ (126,111) Ber(%): C 57,15 H 4,80
Gef(%): C 57,04 H 4,94

Nach Abtrennen von 85 und 86 mit Essigester eluiert man mit einem Ethanol-Essigester Gemisch (1:1) und sammelt die Fraktion mit 88. Zu dieser Lösung läßt man etherische Diazomethanolösung zutropfen und läßt dieses Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur 2h stehen. Nachdem man das Lösungsmittel i.Vak. weitgehend entfernt hat chromatographiert man den Rückstand über eine präparative Kieselgelplatte mit Essigester/Toluol (1:1). Man eluiert die Zone mit dem Rf-Wert 0,55 mit Methanol und destilliert nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum bei 70°C-75°C/0,1 Torr.
89a und 89b : Ausbeute: 3%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 1,5(s,3H, CH_3), 1,62(s,3H, CH_3), 2,2-2,7
(m,4H, CH_2), 3,87(s,2H,OH), 3,91(s,6H, O-CH_3)
4,16(s,3H, O-CH_3)

IR: (Film) 3400, 1710, 1625, 1460, 1130 cm^{-1}

Die Trennung der Dimethylether 89a und 89b gelingt gas-
chromatographisch (Bedingungen siehe 1.2). Mit Hilfe der
Kombination GC-MS sind die Massenspektren MS-I und MS-II
erhältlich:

MS-I: 172(36, M^+) 157(7) 155(6) 126(29) 101(19) 97(12)
83(17) 69(16) 43(100)

MS-II: 172(39, M^+) 157(95) 129(16) 97(24) 83(18) 69(74)
43(100) 41(58)

11. Derivate der Verbindungen 85 und 86

11.1 Umsetzung der Diketoverbindung 86 mit O-Methyl- hydroxylamin-Hydrochlorid

1 mmol (126 mg) 86 und 2 mmol (168 mg) O-Methylhydroxyl-
amin-Hydrochlorid werden in 5 ml Wasser gelöst und 5 min
auf 80°C erwärmt. Die erkaltete Lösung wird mit Ether ex-
trahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel
entfernt, der verbleibende Rückstand in wenig Ether um-

kristallisiert.

Ausbeute: 80%, Smp. 157°C (zers.), RT 12 min (Gaschromatographische Bedingungen siehe 1.2)

82: kann durch Vergleich der Spektren identifiziert werden (siehe 9.2)

11.2 Umsetzung von 85 mit O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid

2 mmol (168 mg) O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid werden in 5 ml Wasser gelöst, mit 3 mg Natriumacetat und ca. 2 ml Eisessig wird diese Lösung auf einen pH-Wert von 5 eingestellt und auf 80°C (Ölbadtemperatur) erwärmt. Zu dieser Lösung läßt man 1 mmol (126 mg) 85 in 5 ml Wasser tropfen, erwärmt weitere 15 min bei 80°C und extrahiert bei saurem pH-Wert mit Ether. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand bei $95^{\circ}\text{C}/0.1$ Torr im Hochvakuum sublimiert.

82: kann durch Vergleich der Spektren identifiziert werden (siehe 9.2); Ausbeute 35%

11.3 Reaktion der Methylenreduktinsäure(85) mit methanol. Salzsäure

Eine Lösung von 2 mmol (252 mg) 85 in 20 ml Methanol wird mit 2 Tropfen conc. Salzsäure versetzt und 3 h unter Rückfluß erwärmt. Nach Einengen des Lösungsmittels nimmt man

den Rückstand mit 30 ml Wasser auf und schüttelt die wässrige Phase mit 50 ml Ether aus. Der verbleibende Rückstand wird fraktioniert destilliert.

Das bei 80°C/0.1 Torr erhaltene Öl kann durch Spektrenvergleich ²⁹ als 1-Methyl-1,2,3-trimethoxy-cyclopent-2-en-4-on (97) identifiziert werden.

Die durch Sublimation im Hochvakuum bei 60°C/0,1 Torr erhaltenen farblosen Kristalle können durch Spektrenvergleich ²⁹ als 1,1-Dimethoxy-3-hydroxy-4-methyl-cyclopent-3-en-2-on (98) identifiziert werden.

12. Gaschromatographische Bestimmung von 97 und 98

Säule, Injektor- und Detektortemperatur, sowie Gasdurchfluß siehe 1.2;

Säulentemperatur: 70°C-200°C mit einer Aufheizrate von 4°C/min

RT von 97 17,5 min

RT von 98 20,5 min

13. Synthese der Aminoreduktone 99 und 100

13.1 Herstellung des Aminoreduktions 99 aus 38 oder 85

1 mmol (211 mg) 38 oder entsprechend 1 mmol (126 mg) 85

und 2 mmol (279 mg) Glycinethylester-Hydrochlorid werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst und 15 min auf 100°C (Ölbadtemperatur) erwärmt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vapsilator, wird der Rückstand mit 30 ml Wasser aufgenommen und im Perforator mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. chromatographiert man über präparative Kieselgelplatten mit Essigester-Methanol (4+1). Die Zone mit dem Rf-Wert 0,32 wird mit Methanol eluiert, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand in wenig Essigester umkristallisiert.

99: Smp. 172°C, Ausbeute 25%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 1,23(t, J=7Hz), 3,10(s verbr., 2H, CH_2),
4,20(q, J=7Hz, 2H, O-CH_2), 4,23(s, 2H, N-CH_3)
5,13(s verbr., 1H, olefin-H), 5,76(s verbr.,
1H, olefin-H)

IR : (KBr) 3350, 1740, 1690, 1540, 1215, 1140, 1080 cm^{-1}

MS : m/e 211(93, M^+) 165(39) 149(20) 138(100) 137(98)
110(72) 82(38) 51(50) 50(35) 69(37) 55(42)
43(40) 41(39)

UV (in Methanol) λ_{max} = 345 nm, $\log \epsilon$ = 4,29

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (211,217) Ber(%): C 56,87 H 6,20 N 6,63
Gef(%): C 56,87 H 6,15 N 6,28

13.2 Herstellung des Aminoreduktons 100 aus 38

Aus 1 mmol (211 mg) 38 erhält man das Aminoreduktion 100 nach Vorschrift 13.1; Rf-Wert 0,57

100: Smp. 179°C Ausbeute 15%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 3,18(s verbr., 2H, CH_2), 4,67(s, 2H, N- CH_2)
5,13(s verbr., 1H, olefin-H), 5,74(s verbr.,
1H, olefin-H), 7,38(s, 5H, aromaten-H)

IR: (KBr) 1660, 1650, 1550, 1510, 1420, 1350, 1120,
1070, 700 cm^{-1}

MS: m/e 215(93, M^+) 91(100) 65(25) 58(30) 43(90)

Literaturverzeichnis

- 1) L.C.Maillard, C.R.hebd.Seances Acad.Sci. 154, 66 (1912)
- 2) H.v.Euler, R.Eistert, Chemie und Biochemie der
Reduktone und Reduktonate, F.Enke-Verlag Stuttgart 1957
- 3) H.v.Euler, C.Martius, Liebigs Ann.Chem. 503, 73 (1933)
- 4) H.F.Bauer, C.Teed, Canadian Journal Chem. 33, 1824 (1955)
- 5) T.Reichstein, R.Oppenauer, Helv.Chim.Acta 16, 988 (1933)
17, 390 (1934)
- 6) G.Hesse, B.Webling, Liebigs Ann.Chem. 679, 100 (1964)
- 7) E.Stutz, H.Deuel, Helv.Chim.Acta 41, 1722 (1958)
- 8) D.M.W.Anderson, S.Garbutt, J.Chem.Soc. 3204 (1963)
- 9) F.Weygand, Ber.dtsch.chem.Ges. 73, 1259 (1940)
- 10) R.Kuhn, F.Weygand, Ber.dtsch.chem.Ges. 70, 769 (1937)
- 11) K.Heyns, K.H.Eichstedt, K.H.Meinecke, Chem.Ber. 88, 1551 (1955)
- 12) F.D.Mills, J.E.Hodge, Carbohydrate Research 51, 9 (1976)
- 13) G.R.Jurch, J.H.Tatum, Carbohydrate Research 15, 233 (1970)
- 14) Th.Severin, W.Seilmeier, Z.Lebensm.Unters.-Forschung
137, 1 (1968)
- 15) H.Ito, Agr.Biol.Chem. 41, 1307 (1977)
- 16) F.D.Mills, J.agric.Food Chem. 26/4, 894 (1978)
- 17) W.Seilmeier, Diss. München 1968
- 18) J.E.Hodge, B.E.Fischer, E.C.Nelson, Am.Soc.Brewing
Chemists Proc. 84 (1963) ; C.A. 60 6178 (1964)
- 19) P.E.Shaw, R.E.Berry, J.agric.Food Chem. 25, 641 (1977)
- 20) J.O.Rodin, J.Food Sci. 30, 280 (1965)
- 21) J.E.Hodge, C.E.Rist, J.Amer.Chem.Soc. 75, 316 (1953)
- 22) F.Weygand, H.Simon, W.Bitterlich, J.E.Hodge, B.E.Fischer
Tetrahedron 6, 123 (1959)

- 23) H.Simon, G.Heubach, W.Bitterlich, H.Gleinig, Chem.Ber. 98, 3692 (1965)
- 24) H.Simon, G.Heubach, Chem.Ber. 98, 3703 (1965)
- 25) B.E.Fischer, J.E.Hodge, J.Org.Chem. 29, 776 (1964)
- 26) H.Simon, Chem.Ber. 95, 1003 (1962)
- 27) F.D.Mills, B.G.Baker, J.E.Hodge, Carbohydrate Research 15, 205 (1970)
- 28) F.Ledl, Th.Severin, Z.Lebensm.Unters.-Forschung 169, 173 (1979)
- 29) H.Pehr, G.Manninger, Th.Severin, Carbohydrate Research 64, 1 (1978)
- 30) K.Schank, D.Wessling, Liebigs Ann.Chem. 710, 137 (1967)
- 31) C.Sabaté-Alduy, J.Bastide, Canadien Journal of Chem. 54/3, 1752 (1976)
- 32) G.Coispeau, J.Elguero, Bull.Soc.Chim.France 2717 (1970)
- 33) F.D.Mills, J.E.Hodge, W.K.Rohwedder, L.W.Tjarks, J.Org.Chem. 38/14, 1512 (1973)
- 34) G.Hesse, H.Broll, W.Rupp, Liebigs Ann.Chem. 697, 62 (1966)
- 35) F.Ledl, Th.Severin, Z.Lebensm.Unters.-Forsch. im Druck
- 36) H.Pehr, Diss. München 1977
- 37) R.Goto, Y.Miyagi, H.Inokowa, Bl.Chem.Soc.Japan 36, 147 (1963)
- 38) G.A.M.van den Ouweland, H.G.Peer, Recueil 89, 750 (1970)
- 39) H.G.Peer, G.A.M. van den Ouweland, Recueil 87, 1017 (1968)

Lebenslauf

Gabriele Irmgard
Fritsch

geboren am 8. Januar 1953 in
Offenburg/Baden als Tochter von
Erich Fritsch und seiner Ehefrau
Irmgard, geb. Nock

Schulen

1960-1964 Volksschule in Offenburg
1964-1972 Okengymnasium in Offenburg

Reifeprüfung

8. Juni 1972

Berufsausbildung

WS 72 bis SS 76 Studium der Chemie
(Diplom, Lehramt) an der Universität
München

WS 76 bis WS 78 Studium der Lebens-
mittelchemie in Hamburg und München

Vorprüfung

November 1976 in München

Hauptprüfung Teil A

Dezember 1978 in München

Seit Februar 1979 arbeite ich unter Anleitung von Herrn
Professor Dr. Th. Severin am Institut für Pharmazie und
Lebensmittelchemie der Universität München an der vor-
liegenden Dissertation.

